ORSAY
Série A. N° 185
N° D'ordre :

thèse

de Doctorat d'Université
spécialité : Neurophysiologie
présentée à

L'UNIVERSITE DE PARIS XI
CENTRE D'ORSAY

par

Jordi Molgó Novell

---

effets du pH externe sur la transmission neuromusculaire chez la grenouille

---

soutenue le septembre 1975 devant la commission d'Examen

Président : P.H. BENOIT

Examinateurs : E. CORABEOUF
A. MALLART
L. TAUC

thèse

de Doctorat d'Université
spécialité : Neurophysiologie
présentée à

L'UNIVERSITE DE PARIS XI
CENTRE D'ORSAY

par

Jordi Molgó Novell

---

effets du pH externe sur la transmission neuromusculaire chez la grenouille

---

soutenue le septembre 1975 devant la commission d'Examen

Président **P.H. BENOIT**

Examinateurs **E. CORABEOUF**
A. MALLART
L. TAUC

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé à l'Unité de Physiologie Neuromusculaire du laboratoire de Neurobiologie cellulaire, C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette (91190) France.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Benoit, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du Jury de cette thèse.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Coraboeuf qui a très aimablement accepté d'être mon Directeur de thèse et de faire partie de ce même Jury.

Je remercie aussi Monsieur L. Tauc, Directeur du laboratoire de Neurobiologie cellulaire de faire partie de ce Jury, et de m'avoir depuis le Chili, octroyé le privilège de travailler dans son laboratoire, car c'est bien grâce à lui et à une bourse du gouvernement français si je suis venu en France.

Je suis très heureux de trouver ici une occasion de témoigner à Monsieur A. Mallart, ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son Unité de Physiologie Neuromusculaire et orienté vers l'étude des problèmes de la transmission synaptique. Tout au long de ce travail, il m'a dispensé ses conseils, suggestions et encouragements, et a collaboré dans une part importante aux expériences exposées dans cette thèse. Il m'a également aidé à la rédaction de ce mémoire et je souhaite qu'il trouve ici l'expression d'une très sincère et amicale reconnaissance.

Je tiens à remercier mon ami Alain Trautmann pour de nombreuses et fécondes discussions et pour son soutien au cours de ce travail où il m'a fait bénéficier de ses connaissances théoriques et pratiques en Neurobiologie.

Je tiens également à remercier Nelly Zilber-Gachelin avec laquelle j'ai effectué des expériences préliminaires à ces résultats.

C'est grâce à l'appui bienveillant et efficace de Monsieur le Professeur Lechat que je dois d'avoir pu poursuivre ce travail, et je voudrais lui exprimer ici ma déférente gratitude.

Je voudrais exprimer aussi toute ma reconnaissance à Madame Lemeignan pour m'avoir aidé à la détermination du calcium ionisé, et à la correction de mon français dans une part de cette thèse

Je voudrais aussi remercier Mesdames Soulier et Petitjean et Mademoiselle Ruaux qui ont dû dans un temps spécialement court, assurer la mise en forme définitive de ce mémoire, ainsi que tous les chercheurs et techniciens du laboratoire de Neurobiologie cellulaire pour leur accueil et soutien au cours de cette période; enfin, toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont permis de poursuivre ces études.

S O M M A I R E

- INTRODUCTION GENERALE p.1

- RAPPEL DE QUELQUES ASPECTS MORPHOFONCTIONNELS DE LA TRANSMISSION NEUROMUSCULAIRE p.2

  - examen histologique et localisation des récepteurs p.2 - 6
  - potentiel de plaque motrice p.6
    a) changement de conductance produit par l'acétylcholine p.7
    b) Bases ioniques du potentiel de plaque motrice p.9
    c) Cours temporel du courant de plaque motrice p.13
  - Etude du bruit transmembranaire p.15
  - Libération spontanée de médiateur p.17
    A. amplitude des miniatures p.19
    B. fréquence p.21

- OBJECTIFS EXPERIMENTAUX p.26
- MATERIEL ET METHODES p.27
  a) préparation neuromusculaire
  b) installation de la préparation
  c) dispositif expérimental
  d) technique du potentiel imposé et limitations p.32
  e) enregistrement focal par microélectrode extracellulaire p.35
  f) solution de Ringer et calcium ionisé p.36

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

Chapitre 1 : Effets du pH sur la libération spontanée de l'ACh p.38
  a) fréquence des miniatures p.39
  b) effets de la réduction du K^+ externe sur l'augmentation de fréquence des miniatures à pH acide p.42

c) effets du pH acide sur la fréquence des miniatures dans un milieu de survie dont la concentration du calcium a été modifiée p.42

d) influence de la température sur la libération spontanée de transmetteur aux différents pH p.43

Discussion et conlusion p.45

Chapitre II : Effets du pH sur la quantité de médiateur libérée par le potentiel d'action pré-synaptique et la taille du quantum p.48

a) effets du pH sur l'amplitude du courant de plaque motrice p.48

Discussion et conclusion p.50

b) effets du pH sur la taille du quantum p.50

Discussion et conclusion p.54

c) effets du pH sur le contenu quantique moyen du courant de plaque motrice p.54

Discussion et conclusion p.59

Chapitre III : Effets du pH sur le cours temporel du courant synaptique

a) effets du pH sur le cours temporel du courant de plaque motrice p.61

b) effets du pH sur le cours temporel des courants miniature. p.65

Discussion et conclusion p.68

c) effets du pH sur le cours temporel du courant de plaque motrice (cpm) et des courants miniature (cpmm) en présence de prostigmine p.70

a- cours temporel du cpm p.71
b- cours temporel des cpmm p.73

Discussion et conclusion p.75

d) effets de la d-Tubocurarine sur le cours temporel du courant de plaque motrice à différents pH. p.76

Discussion p.80

e) effets du pH sur le cours temporel des courants synaptiques évoqués par l'application ionophorétique de l'ACh p.81

Discussion et conclusion p.85

f) effets de la température sur le cours temporel du cpm à différents pH. p.87

Discussion p.93

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES p.94

Résumé p.97

Bibliographie

INTRODUCTION GENERALE

La jonction neuromusculaire a servi pendant longtemps comme modèle pour les synapses à médiation chimique; en général, elle constitue en raison de sa facilité d'accès, un très bon matériel d'étude des mécanismes élémentaires de la transmission synaptique.

Nous nous sommes adressés à cette préparation pour aborder l'étude des effets du pH extracellulaire sur la transmission neuromusculaire en essayant de préciser de façon aussi quantitative que possible, ces effets sur la libération spontanée, et évoquée de transmetteur. Sur la base de ces données, nous avons étudié, par la suite, certains aspects des réponses post-synaptiques, notamment, le cours temporel du courant de plaque motrice, qui subit des changements importants lorsque le pH est modifié.

Avant de présenter nos résultats expérimentaux, nous consacrons un chapitre à un exposé des travaux fondamentaux antérieurs sur la transmission neuromusculaire, puis nous définissons avec précision les méthodes utilisées. Après quoi, nous exposons successivement les résultats expérimentaux et les interprétations possibles concernant les effets pré- et post-synaptiques du pH.

RAPPEL DE QUELQUES ASPECTS MORPHOFONCTIONNELS DE LA TRANSMISSION NEUROMUSCULAIRE.

A peu près quarante ans ont passé depuis que Dale, Feldberg et Vogt, 1936, ont pu démontrer que l'acétylcholine (ACh) est libérée à la jonction neuromusculaire après stimulation nerveuse et qu'elle peut être mesurée directement dans le liquide extracellulaire si l'on prévient son hydrolyse par les cholinestérases. Depuis, il est admis que l'ACh est le médiateur chimique au niveau des jonctions neuromusculaires des vertébrés.

L'ACh est synthétisée dans le cytoplasme des terminaisons nerveuses à partir de l'acétylcoenzyme A, d'origine mitochondriale et de la choline puisée dans le milieu extracellulaire, essentiellement à partir du plasma et des produits de l'hydrolyse de l'ACh par un processus de transport actif (Potter, 1970). Dans le cytoplasme, une enzyme , la cholineacétylase assure et catalyse la synthèse (Hebb, 1972). Une fois synthétisée, l'ACh est incorporée et stockée à l'intérieur des vésicules synaptiques par un mécanisme encore mal connu; les vésicules, de façon spontanée ou, lors d'une stimulation nerveuse, fusionnent avec la membrane présynaptique et leur contenu est libéré dans la gouttière synaptique.

A l'examen histologique, la jonction neuromusculaire présente une ultrastructure complexe très particulière, comme le montre la figure 1.

Au voisinage immédiat de la cellule musculaire qu'il innerve, l'axone perd son enveloppe de myéline et se ramifie en fines branches qui établissent une série de contacts avec une zone spécialisée de la fibre musculaire, la plaque motrice.

Fig. 1 : Microphotographie de jonction neuromusculaire de grenouille (muscle couturier), observée au microscope électronique (X 13 500), section parallèle à l'axe de la terminaison nerveuse.

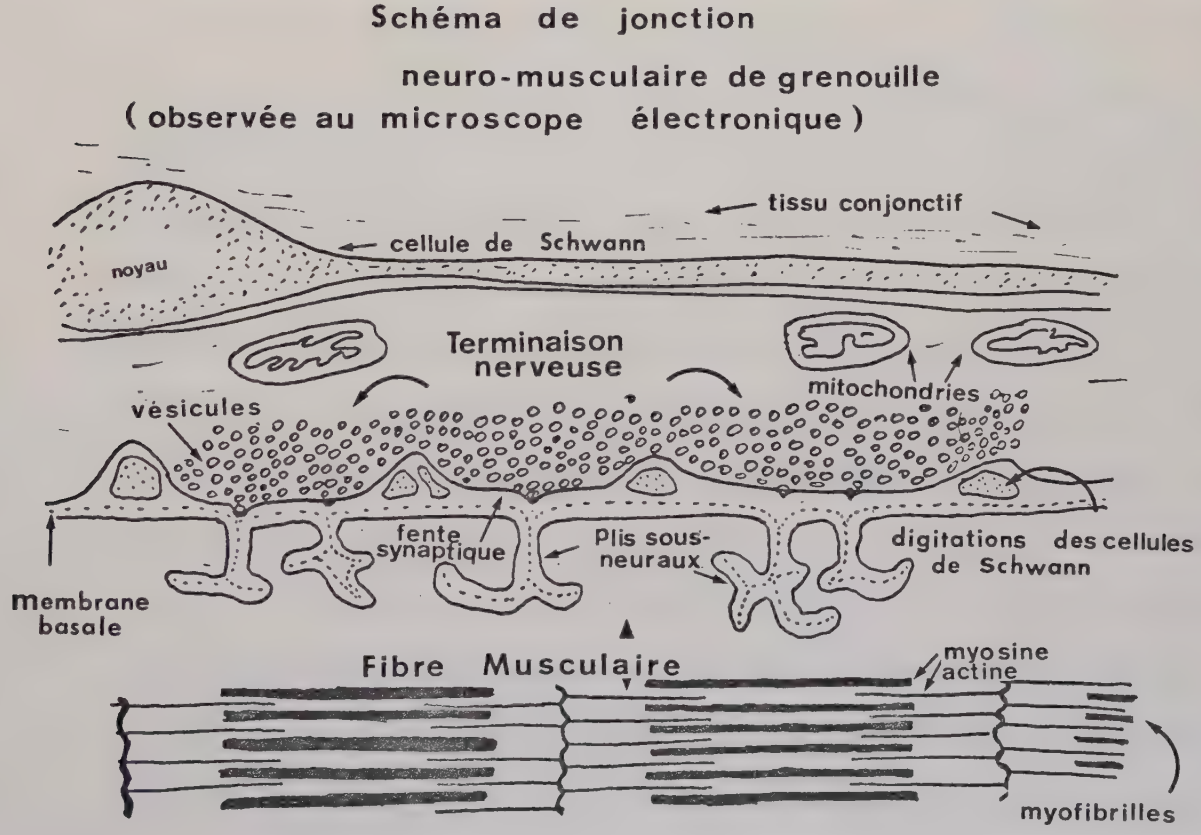


Fig. 2 : Dessin schématique de jonction neuromusculaire de grenouille

La plaque représente une très petite fraction du total de la longueur de la fibre musculaire (chez les Batraciens, de 50 à 400 µm).

Comme le montre la figure 1, les terminaisons nerveuses sont recouvertes par les cellules de Schwann qui les séparent du tissu conjonctif. Le cytoplasme des terminaisons nerveuses avait déjà attiré l'attention des microscopistes optiques, étant donné le grand nombre de mitochondries présentes, signe d'intense activité métabolique.

La microscopie électronique a révélé l'existence de vésicules d'environ 500 Å de Ø dénommées vésicules synaptiques (De Robertis et Bennett, 1954). Les vésicules synaptiques sont groupées en face de l'ouverture des plis sous-neuraux formés par la membrane post-synaptique. Il est vraisemblable que la libération de transmetteur se réalise dans les "zones actives" (Couteaux et Pécot-Dechavassine, 1970 ; Heuser et Reese, 1973; Ceccarelli, Hurlbut et Mauro, 1973; Dreyer, Peper, Akert, Sandri et Moor, 1973), par un mécanisme probable d'exocytose. Les zones actives sont visibles sur les coupes longitudinales des terminaisons, elles sont distantes de 0,5 à 1,5 µ et séparées par des digitations des cellules de Schwann, satellites de la terminaison nerveuse. Il y a donc environ 100 à 200 sites sur une extension terminale de 100 à 200 µ (Katz, 1969a). Selon des études récentes, il existerait des relations entre la cytoarchitecture de ces "zones actives" et l'activité pré-synaptique.Les études en microscopie électronique ont confirmé une idée très importante, celle de Ramon y Cajal (1909) , qui a donné appui à sa théorie, théorie neuronale selon laquelle la membrane qui entoure le neurone est continue et indépendante des membranes avec lesquelles elle entre

en contact. En effet, l'examen au microscope électronique montre que les membranes des cellules nerveuses et musculaires sont séparées par un espace de 200 à 500 Å, structure appelée fente ou gouttière synaptique au niveau de leur contact. La jonction neuromusculaire se différencie des autres synapses par l'existence d'une structure particulière de la membrane post-synaptique appelée appareil sous-neuronal (Couteaux 1947). La fig.2 montre un dessin semi-schématique des caractéristiques d'une plaque motrice.

Sur les fibres musculaires à contraction rapide, la membrane musculaire sous-neuronale présente des invaginations dont l'orientation est perpendiculaire à l'axe de l'axone (plis sous-neuronaux). Des études histochimiques ont montré une concentration importante d'acétylcholinestérase dans les invaginations de la membrane musculaire au niveau de sa face externe, au niveau de la fente synaptique (Koelle et Friedwald, 1949; Couteaux, 1955; Hall, 1973).

Les analyses détaillées à l'aide de l'application ionophorétique d'ACh montrent que la plupart des récepteurs sur le muscle strié normal sont groupés sur la surface externe de la membrane au niveau de la plaque motrice (Del Castillo et Katz, 1955a; Miledi, 1960; Feltz et Mallart, 1971a; Peper et McMahan, 1972). Les zones aneurales sont dépourvues de sensibilité détectable par ionophorèse. Par contre, une zone de sensibilité mineure se présente dans les régions juxtatendineuses et les régions périsynaptiques. L'existence de cette zone est due à la présence de récepteurs extrajonctionnels (Miledi, 1960ab; Feltz et Mallart, 1971, Dreyer et Peper, 1974).

En dépit du fait que ces méthodes ionophorétiques ne permettent pas de déterminer quantitativement la densité des récepteurs elles donnent cependant une bonne image de la distribution des sites récepteurs. Le marquage autoradiographique associé à l'emploi de certaines biotoxines (α-Bungarotoxine, α-najatoxine) inhibitrices

irréversibles et présentant une affinité "spécifique" pour le récepteur cholinergique apparaît aujourd'hui comme la méthode fournissant l'image la plus directe de la distribution des récepteurs et de leurs propriétés. (Miledi et Potter, 1971b; Colquhoun Rang et Ritchie, 1974 ; Barnard, Wieckowski et Chiu, 1971 ; Hartzell et Fambrough, 1972 ; Porter, Barnard et Chiu, 1973).

Ainsi, la densité moyenne de sites récepteurs au niveau de la zone synaptique est comprise entre 3 x $10^3/\mu^2$ à 8,8 x $10^3/\mu^2$. Des études récentes montrent que les récepteurs ne sont pas répartis sur toute la surface des plis sous-neuraux mais seulement au niveau des crêtes dans la zone la plus proche de la membrane pré-synaptique. La densité des récepteurs atteindrait à ce niveau des valeurs comprises entre 2 et 3 x $10^4/\mu^2$ (Fertuck et Salpeter, 1974; Porter et Barnard, 1975).

Nous allons maintenant exposer les principaux aspects électrophysiologiques du mécanisme de la transmission neuromusculaire.

LE POTENTIEL DE PLAQUE MOTRICE (ppm)

Une onde électrique lente, non propagée, différente du potentiel d'action propagé et constituant le premier signe décelable de l'action de l'influx nerveux sur la membrane post-synaptique a été mise en évidence lors d'enregistrements extracellulaires au niveau de la plaque motrice. (Göpfert et Schaefer, 1938; Eccles et O'Connor, 1939; Feng, 1940). Cette onde a reçu le nom de potentiel de plaque motrice (ppm). Eccles, Katz et Kuffler,(1941) ont montré sur des muscles curarisés que le ppm est assimilable au moins dans sa phase terminale , à une dépolarisation de potentiel électronique.

Le potentiel d'action musculaire est déclenché par le ppm qui le précède dans le temps (Kuffler, 1942). Les limitations techniques de l'enregistrement extracellulaire ne permettaient guère de déterminer avec beaucoup plus de précision le mécanisme de la transmission neuromusculaire. Ce n'est qu'après la mise au point des techniques d'enregistrement intracellulaires au niveau de la jonction neuromusculaire de Grenouille faite par Fatt et Katz, (1951), que les actions du transmetteur ont été décrites au niveau unitaire pour la première fois. Dans ces conditions, le ppm recueilli précisément au niveau de la plaque motrice est caractérisé par un temps de montée rapide et une phase de décroissance beaucoup plus lente.

A mesure que l'on s'éloigne de la plaque, l'amplitude se réduit et le cours temporel s'allonge. Ces modifications sont prévisibles si l'on considère le ppm comme un bref courant ionique à travers la membrane jonctionnelle, suivi d'un phénomène passif dépendant seulement des propriétés électriques de la membrane musculaire. Une analyse approfondie des ppm permit à ces auteurs de calculer que la charge déplacée pendant un ppm est de 8×10^{-10} coulombs sur le muscle curarisé, ce qui équivaut à un mouvement net de 8×10^{15} ions univalents. Les courants ioniques induits par le transmetteur ont été mesurés directement par Takeuchi (1959), en utilisant la technique du voltage imposé qui a permis d'étudier les bases ioniques du ppm.

a) Changement de conductance produit par l'acétylcholine.

L'ACh libérée par la terminaison pré-synaptique provoque lors de son interaction avec les récepteurs de la membrane post-synaptique, un changement de conductance. Le courant engendré dépolarise la fibre musculaire et se traduit par un potentiel miniature ou un ppm.

La membrane post-synaptique peut être représentée par la figure suivante (d'après Katz et Thesleff, 1957) modifiée par Ginsborg, 1973.

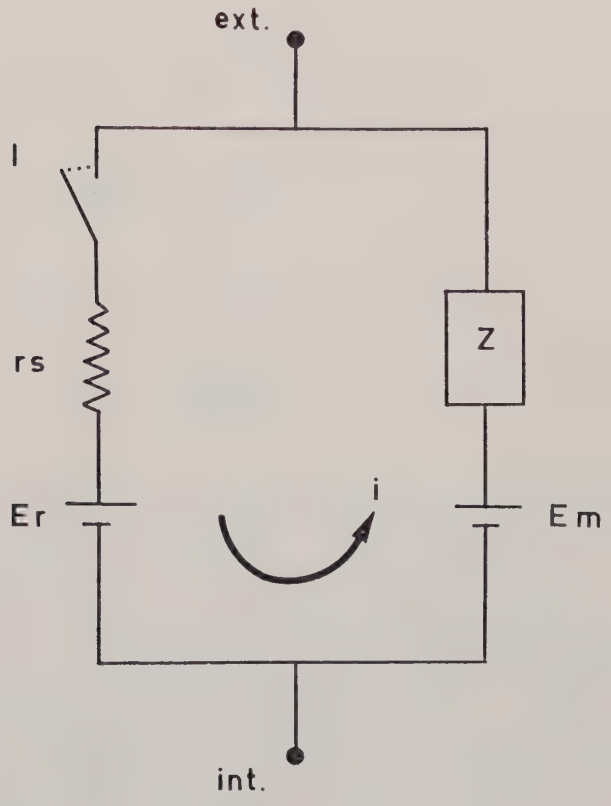


Fig. 3 : Circuit électrique équivalent pour rendre compte de l'action de l'ACh au niveau de la plaque motrice.
Ce circuit équivalent, théorique comporte une branche synaptique (à gauche) dont la structure rend compte de l'action du transmetteur au niveau des récepteurs en parallèle avec une branche non synaptique (à droite) qui comprend une impédance (z) en série avec une batterie imag du potentiel de membrane. (Em).

La branche synaptique est composée d'une résistance de Shunt (rs) et d'une batterie qui représente le potentiel d'inversion (Er). L'interaction ACh-récepteur, représentée dans le circuit par la fermeture de l'interrupteur I provoque l'apparition d'un courant i.

Lorsqu'on mesure le changement de potentiel (V), résultat du courant i aux bornes de la résistance de membrane et, si Z est assimilé à une résistance pure R, l'amplitude de la dépolarisation entraînée par l'ACh sera donnée par :

$$V = (Em-Er)\ \frac{R}{rs+R}$$

Si l'on tient compte de sa capacité :

$$V = (Em-Er)\ \frac{|\vec{Z}|}{|\vec{rs}+\vec{Z}|}$$

et, lorsqu'on mesure le courant synaptique en voltage imposé, étant donné que le système de clamp fournit "instantanément" un courant égal et opposé au courant synaptique pour maintenir Em constant, le courant net traversant Z est donc nul :

$$i = \frac{(Em - Er)}{rs}$$

Cette méthode permet de s'affranchir de l'impédance de la membrane non synaptique et donc, d'étudier le courant synaptique dû aux mouvements d'ions à travers la membrane.

b) Bases ioniques du potentiel de plaque motrice.

Sur le muscle normal, lorsque la stimulation présynaptique induit un ppm dont l'amplitude est suffisante pour dépasser un niveau critique appelé seuil, un potentiel d'action musculaire

est recueilli au niveau de la plaque motrice. Fatt et Katz, (1951), ont montré que le potentiel d'action recueilli au niveau de la jonction, présente un décours temporel différent de celui obtenu par stimulation directe des fibres musculaires. Ces auteurs ont suggéré que ce phénomène consiste en une augmentation non spécifique des conductances ioniques, qui court-circuite la membrane. Del Castillo et Katz, (1954 d), reprenant ces expériences ont montré que si le potentiel de plaque motrice était évoqué pendant un potentiel d'action musculaire au moment où le potentiel de membrane est égal à -15 mV, ou plus positif, le ppm est annulé ou inversé et ramène le potentiel de membrane vers -15 mV. Par ces résultats, l'hypothèse de Fatt et Katz selon laquelle l'association ACh-Récepteur détermine une chute locale de la résistance membranaire est vérifiée. Le court-circuit qui en résulte tend à déplacer le potentiel de membrane vers - 10 ou - 20 mV.

Ce potentiel ne correspond pas aux potentiels d'équilibre des ions Na^+ ou K^+ ou Cl^+ pris isolément (calculés selon l'équation de Nernst). Plusieurs ions doivent donc participer à l'augmentation de conductance.

En 1955, Del Castillo et Katz ont montré l'existence d'un court-circuit lors de l'action de l'ACh en expérimentant en absence de Na^+, dans un milieu isotonique contenant du K^+. Par la technique du voltage imposé, Takeuchi et Takeuchi, (1960), ont pu mesurer le courant de plaque motrice dans des solutions de différentes compositions ioniques et en présence de T-tubocurarine. Dans ces conditions, ils ont décrit que le courant de plaque motrice (cpm), varie linéairement avec le potentiel de membrane lorsque celui-ci est compris entre - 50 et - 150 mV. Au cours de ces mêmes expériences, ces

auteurs ont également déterminé par extrapolation le potentiel d'inversion (Er), c'est-à-dire, le potentiel de membrane pour lequel le courant net résultant de l'ouverture des conductances synaptiques, est nul. Les potentiels d'inversion, ainsi déterminés, se situent entre E_{Na} (potentiel d'équilibre pour le sodium) = + 50 mV et E_K = -100 mV (potentiel d'équilibre pour le potassium) . Ils sont indépendants de E_{Cl} (potentiel d'équilibre pour le chlore); ceci leur permet d'établir qu'à la jonction neuromusculaire de Grenouille, l'ACh ouvre à la fois, des conductances au sodium et au potassium, mais pas de conductance au chlore. Il en découle que :

$$cpm = I_{Na} + I_K$$

Le courant sodique sera égal à :

$$I_{Na} = \Delta g_{Na} (Em - E_{Na})$$

où Δg_{Na} représente le changement de conductance sodique,

Em " le potentiel de membrane,

E_{Na} " le potentiel d'équilibre donné par l'équation de Nernst pour les ions sodium (dans un environnement ionique normal et à 20°C . (Na) interne = 15,5 mM; (Na) externe = 117 mM

$$E_{Na} = \frac{RT}{F} \ln \frac{(Na)\ Ext}{(Na)\ Int} = + 50,5 \text{ mV}$$

De façon similaire ;

$$I_K = \Delta g_K (Em - E_K)$$

avec $$E_K = 25 \ln \frac{2,5}{138} = 100,2 \text{ mV}$$

donc, le cpm sera donné par :

$$cpm = \Delta g_{Na} (Em - E_{Na}) + \Delta g_K (Em - E_K)$$

Le potentiel d'inversion (Er) où $I_K = I_{Na}$ sera donné par

(Equation de Takeuchi et Takeuchi, 1960) :

$$Er = \frac{RT}{F}\left(\ln\frac{(K)e}{(K)i} + \frac{\Delta g_{Na}}{\Delta g_K}\ln\frac{(Na)e}{(Na)i}\right)\Bigg/\left(1 + \frac{\Delta g_{Na}}{\Delta g_K}\right)$$

Au niveau de Er, les courants de sodium et potassium s'équilibrent exactement de telle façon qu'il n'y a pas de transfert net de charges à travers la membrane, donc, le cpm est nul et le rapport des conductances est donné par la relation de Maeno (1966)

$$\Delta g_{Na}/\Delta g_K = (Er - E_K)/(E_{Na} - Er)$$

Dans un milieu de Ringer normal une valeur de Er = - 15 mV a été obtenue par extrapolation par Takeuchi et Takeuchi.

Si

$$E_K = -100mV \text{ et } E_{Na} = +50 \text{ mV, alors}$$

$$\Delta g_{Na} / \Delta g_K = 85/65 = 1{,}30$$

Contrairement à ce que laissait prévoir la notion de "champ constant" (Goldman, 1943; Hodgkin et Katz, 1949), selon laquelle le potentiel d'inversion devrait dépendre des concentrations de Na^+ et de K^+ externe suivant l'équation :

$$Er = \frac{RT}{F}\ln\frac{\Delta P_K\,(K)i}{\Delta P_K\,(K)e} + \frac{\Delta P_{Na}\,(Na)i}{\Delta P_{Na}\,(Na)e}$$

(dans laquelle ΔP_K et ΔP_{Na} représentent le changement de perméabilité induit par l'ACh), Takeuchi et Takeuchi ont montré que $\Delta g_{Na} / \Delta g_K$ est une constante indépendante des concentrations ioniques externes de sodium. Or, selon le modèle de Goldman, une réduction de la concentration externe de Na de 113 mM à 33 mM devrait réduire la valeur du rapport $\Delta g_{Na} / \Delta g_K$ d'un facteur de 1/3, ce qui n'a pas été

observé expérimentalement. Ultérieurement, Takeuchi, (1963) a montré que la valeur de ce rapport diminue légèrement lorsque la concentration de K^+ augmente.

Ces résultats peuvent être expliqués qualitativement au moins comme étant dus à un mécanisme dans lequel les mouvements de K^+ sortant à travers la membrane activée sont inhibés par l'augmentation du K^+ externe et activés par l'augmentation du sodium externe.

L'augmentation de perméabilité au sodium et au potassium lors de l'interaction ACh-récepteur a été confirmée par Jenkinson et Nicholls, (1961) en mesurant les flux ioniques sur le muscle dénervé de mammifère.

c) Cours temporel du courant de plaque motrice (cpm).

Il est admis que la dépolarisation induite par l'ACh, au niveau de la plaque motrice, résulte d'un flux net d'ions, d'un changement de conductance de la membrane synaptique due à l'union ACh-récepteur et, probablement, à un changement de conformation du récepteur ou d'une molécule associée.

En utilisant la technique du potentiel imposé, (Takeuchi et Takeuchi, 1959; Kordas, 1972; Magleby et Stevens, 1972), ont pu préciser le cours temporel du cpm comme étant constitué d'une phase ascendante d'environ 0,8 msec. de durée qui décroît exponentiellement (après une partie non exponentielle) avec un temps de demi-décroissance voisin d'une milliseconde. Jusqu'en 1971, il a été admis que le décours temporel du cpm était le reflet du cours temporel de la concentration d'ACh au niveau de la gouttière synaptique. Néanmoins, des résultats expérimentaux récents montrent que le décours temporel du cpm ne peut être déterminé ni par diffusion, ni par l'hydrolyse de l'ACh, mais

que l'étape limitante réside au niveau du complexe ACh-récepteur.

Le décours du cpm varie avec le potentiel de membrane. Il s'allonge lorsque le potentiel de membrane augmente (hyperpolarisation (Takeuchi et Takeuchi, 1960; Kordas, 1969; Magleby et Stevens, 1972a.) Après une phase non exponentielle, de 0,5 ms env.,(Kordas, 1972a), le cpm décroît exponentiellement, ce qui peut être représenté par :

$$i(t) = i(o)e^{-\alpha(v)t}$$ (Magleby et Stevens, 1972)

ou i(t) est le cpm, t msec après un temps de référence fixe,

i(o) est le courant initial,

v est le potentiel de membrane,

α (v) est un coefficient qui caractérise la liaison qui existe entre la décroissance du cpm et le potentiel de membrane.

Ce coefficient, qui varie comme une fonction exponentielle du potentiel de membrane, peut être représenté pour des potentiels imposés compris entre + 50 mv et - 150 mv par l'équation suivante :

$$\alpha = B\, e^{AV}$$ (Magleby et Stevens, 1972)

où V, est le potentiel de membrane et A et B sont des constantes.

Takeuchi et Takeuchi avaient initiallement suggéré que le courant nécessaire pour imposer différents potentiels de membrane, pouvait modifier le degré de dispersion de l'ACh libérée à travers la fente synaptique, et de cette façon, rendre compte de la dépendance de la partie exponentielle de la décroissance du cpm par rapport au voltage. Néanmoins, Magleby et Stevens, (1972a) ont montré que α ne varie pas lorsqu'on modifie l'amplitude du cpm par la d-Tubocuranine ou par des stimulations répétitives ou lors de l'inhibition des cholinesterases, En conséquence, il ne semble pas que α soit lié à la

concentration d'ACh dans la fente synaptique. Par conséquent, d'autres facteurs que le degré de disparition de l'ACh gouvernent le décours temporel du cpm. En utilisant un modèle mathématique, Magleby et Stevens ont pu rendre compte de façon précise du décours temporel du cpm sur le muscle de Grenouille et de ses variations avec le potentiel de membrane. Ils estiment que la concentration maximum d'ACh est atteinte en 0,2 msec. et qu'elle décroît avec une constante de temps de 0,2 msec et par conséquent qu'elle est voisine de 0 au moment du pic du cpm. Il semble donc que la vitesse de disparition de l'ACh est trop rapide pour rendre compte du décours temporel du cpm. D'autre part, on ne connaît pas très bien la vitesse d'association ou de dissociation des molécules d'ACh au récepteur mais vraisemblablement elle doit être très rapide.

Donc, le facteur le plus important,déterminant le décours temporel des courants synaptiques après une phase ascendante, qui, pour les miniatures est de 0,1 msec (Gage, McBurney, Schneider, 1975a) et une phase non exponentielle (qui, pour le cpm est de durée variable) est la fermeture des canaux ioniques qui impose une constante de temps d'environ 1,5 msec à la décroissance exponentielle.

D'autres données expérimentales sont à l'appui de l'idée que le décours temporel du cpm ne dépend pas de la concentration d'ACh dans la fente synaptique : l'étude des "courants élémentaires" à partir de l'analyse du "bruit transmembranaire" considéré comme résultant de l'association ACh-récepteur.

ETUDE DU "BRUIT" TRANSMEMBRANAIRE

Une méthode nouvelle décrite par Katz et Miledi a donné des informations sur la cinétique de l'activation des récepteurs. Ces

auteurs ont montré que l'action des différents agonistes appliqués à la jonction neuromusculaire soit par ionophorèse, soit dans la solution Ringer qui baigne la préparation, s'accompagne d'une augmentation du bruit transmembranaire post-synaptique. Ce phénomène n'est pas observé lors des dépolarisations d'amplitudes semblables évoquées par l'application d'un courant électrique par une deuxième microélectrode (Katz et Miledi, 1970). Cet effet est observé lorsqu'on enregistre localement par une microélectrode externe, le courant au lieu du potentiel (Katz et Miledi, 1972), donc il semble que le bruit représente des fluctuations de la conductance de membrane gouvernée par l'ACh. Katz et Miledi ont suggéré que le bruit peut refléter des courants élémentaires dont la somme déterminerait la dépolarisation produite par l'agoniste. Chaque courant élémentaire pouvant refléter l'ouverture et la fermeture des voies ioniques par lesquelles les cations traversent la membrane lors de l'union ACh-récepteur. Une estimation de la durée et de l'amplitude des conductances élémentaires, a pu être réalisée par l'analyse du spectre de la densité de fréquences (power spectrum) du bruit transmembranaire (Katz et Miledi, 1971, 1972, 1973b).

Les analyses de fréquence du bruit induit par l'ACh et enregistrées intracellulairement ont confirmé que les caractéristiques électriques passives de la fibre sont les principales déterminantes du décours temporel du bruit. Cette technique donne peu d'information sur le décours temporel du changement de conductance mais, par ailleurs, permet de mesurer la durée moyenne et l'amplitude de la dépolarisation associée à un courant élémentaire. En enregistrant le bruit avec une

électrode extracellulaire placée au voisinage d'une terminaison nerveuse, Katz et Miledi ont estimé que la durée moyenne des changements élémentaires de conductance est d'environ 1 msec à 20°C pour l'ACh.

En dépit du fait que l'enregistrement extracellulaire n'est pas limité par les propriétés passives de la membrane, il a l'inconvénient de ne pas pouvoir être utilisé pour mesurer les valeurs absolues du courant étant donné que le signal enregistré dépend critiquement de la position de la microélectrode. Le changement de conductance résultant du bruit transmembranaire postsynaptique a pu être examiné plus directement en utilisant la technique du potentiel imposé (Anderson et Stevens, 1973) qui a permis de déterminer à partir du bruit transmembranaire que la durée moyenne d'ouverture des canaux (déterminée par cette méthode) correspond avec la constante de temps de la décroissance du cpm et montre les mêmes variations avec le potentiel de membrane et la température.

La correspondance entre la constante de temps de la décroissance et la durée moyenne d'ouverture des canaux ioniques donne une évidence supplémentaire au fait que le décours temporel du cpm dépend davantage des propriétés des canaux ioniques que du décours temporel de la concentration d'ACh.

La valeur du changement de conductance élémentaire induit par l'ACh est de 1,8 à 3 x 10^{-11} mho (Anderson Stevens, 1973; Ben-Haim, Dreyer et Peper, 1975, des valeurs similaires en potentiel imposé ont été obtenues par Sachs et Lecar, (1973) sur le muscle de poulet en culture (8 x 10^{-11} mho). Ces valeurs diffèrent peu de celles calculées par Katz et Miledi (10^{-10} mho).

A partir de ces valeurs, ces différents auteurs ont calculé qu'au potentiel de repos, chaque courant élémentaire est associé à un transfert de charge équivalent de 2 à 5 x 10^4 ions univalents.

Katz et Miledi,(1973b), en utilisant l'analyse du spectre de densité de fréquence ont montré que la durée d'ouverture des canaux ioniques résultant de l'interaction, avec les récepteurs, du carbachol, decamethonium et acetylthiocholine est inférieure à celle de l'ACh; par contre, la suberyldicholine active les canaux pendant plus longtemps. Ces études ont été confirmées par Colquhoun, Dionne, Steinbach et Stevens, 1975). Ces résultats indiquent que la durée du complexe agoniste-récepteur activé et le changement de conductance sont liés.

D'autre part, le blocage des récepteurs par la d-tubocurarine ou l' α-bungarotoxine diminue la fréquence des courants élémentaires évoqués parl'ACh. Néanmoins, il n'y a pas de changement de leur amplitude ni de leur durée. Des effets similaires ont été montrés pendant la désensibilisation par l'ACh : la fréquence des courants élémentaires diminue mais ne modifie pas leur amplitude ni leur cours temporel.

LIBERATION SPONTANEE DE MEDIATEUR.

En 1950, Fatt et Katz découvrirent des potentiels de faible amplitude et dont le cours temporel est analogue à celui du potentiel de plaque motrice, au cours d'enregistrements intracellulaires au niveau de la plaque motrice de Grenouille.

Ces potentiels qui se produisent spontanément et à des

intervalles de temps aléatoires en absence de toute stimulation nerveuse ont été dénommés : potentiels miniatures de plaque motrice (ppmm) Fatt et Katz , (1952).

L'existence de tels potentiels a été démontrée non seulement sur les jonctions neuromusculaires des muscles à contraction rapide de batraciens et de mammifères (Boyd et Martin; 1956, Liley 1956 Brooks, 1956; Elmqvist et al, 1964) mais aussi sur les muscles de volailles(Ginsborg, 1960), poissons (Takeuchi, 1959b) et sur les muscles à contraction lente de différentes espèces de vertébrés (Burke, 1957; Ginsborg, 1960; Hess et Pilar, 1963).

A- Amplitude des ppmm :

Les premiers enregistrements des ppmm au niveau de la jonction neuromusculaire de Grenouille ont montré que les amplitudes de ces potentiels se répartissent symétriquement autour d'une valeur modale suivant une distribution Gaussienne.

Les changements d'amplitude des ppmm peuvent être, à peu d'exceptionsprès, attribués au changement des propriétés de la membrane postsynaptique (Katz, 1962). Le diamètre de la fibre musculaire influence 1'amplitude des ppmm (Katz et Thesleff, 1957). Lorsque le diamètre augmente, la résistance de membrane diminue, la capacité apparente spécifique de la fibre augmente (Hodgkin et Nakajima, 1972), et 1'amplitude des potentiels miniatures diminue. Selon les travaux récents de Gage et McBurney, (1973), il a été démontré que la capacité a un effet beaucoup plus marqué que la résistance sur 1'amplitude des ppmm.

L'amplitude des ppmm est remarquablement constante ,

même dans des conditions qui augmentent significativement la fréquence de libération. Chaque ppmm est dû à la libération de 15.000 à 60.000 molécules d'acétylcholine (Del Castillo et Katz, 1956b; Straughan, 1960; Canepa, 1964; Elmqvist et Quastel, 1965b) et constitue un quantum de médiateur. Selon l'hypothèse vésiculaire (Del Castillo et Katz, 1955b), chaque quantum d'ACh libéré correspondrait au contenu d'une vésicule synaptique.

L'amplitude des ppmm peut être modifiée par des agents pharmacologiques qui influencent l'interaction ACh-réception. Par exemple, la d-Tubocuranine et d'autres agents curaromimétiques qui inhibent de façon compétitive l'action de l'ACh (Jenkinson, 1960) peuvent selon la dose employée, diminuer ou annuler l'amplitude des ppmm. Les anticholinestérasiques tels que l'ésérine, la prostigmine, et l'édrophonium, en empêchant l'hydrolyse du transmetteur, augmentent l'amplitude et la durée des ppmm.

Divers moyens expérimentaux capables de modifier la taille du quantum ont été décrits. L' hémicholinium réduit la synthèse d'ACh en inhibant le transport de choline de façon compétitive (Schueler, 1961); appliqué à la jonction neuromusculaire de mammifère, ce produit provoque une diminution des ppmm (Elmqvist et Quastel, 1965a) en même temps qu'une réduction du volume des vésicules synaptiques (phénomène observé au microscope électronique par Jones et Kwanbunbumpen, 1970a-b).

D'autres recherches sur la plaque motrice de Grenouille ont montré l'apparition de potentiels spontanés de grande amplitude et dits "géants", dont l'amplitude ne peut être expliquée par la seule addition des effets de plusieurs quanta libérés simultanément en divers points de la jonction neuromusculaire. Ces ppmm ont été

observés lorsque la composition ionique de la solution de Ringer a été modifiée (Katz et Miledi, 1969b; Pécot-Dechavassine, 1970; Pécot-Dechavassine et Couteaux, 1972; Heuser, Katz et Miledi, 1971a) Heuser et Miledi, 1971; Benoit, Audibert-Benoit et Peyrot, 1973). L'étude comparée des modifications morphologiques qui sont associées à ces potentiels dits géants a montré des changements de la cyto-architecture de la population vésiculaire (Heuser et al, 1971a) avec de grosses vésicules synaptiques. D'après ces observations, les potentiels géants pourraient traduire la libération d'unités multiquantiques (Couteaux, Pécot-Dechavassine, 1973).

B - Fréquence des ppmm

La fréquence de libération des ppmm est variable d'une jonction neuromusculaire à une autre. Récemment, une corrélation significative entre la fréquence moyenne des ppmm et l'aire de la plaque motrice a été démontrée (Kuno, Turkanis et Weakly, 1971).

Les intervalles de temps entre deux ppmm successifs sont irréguliers et répartis au hasard : en conditions normales, la probabilité d'apparition ne dépend pas de l'évènement précédent.

En appelant T l'intervalle moyen entre deux miniatures, Pour un intervalle de temps Δt très bref par rapport à T, la probabilité P d'apparition d'un ppmm est égale à $\Delta t/T$. Lorsque t augmente, la probabilité p augmente de façon exponentielle, en accord avec l'équation $p = 1 - \exp(-t/T)$ (Fatt et Katz, 1952).

La pression osmotique peut modifier la fréquence des ppmm, la libération spontanée des ppmm est nettement accrue lorsque la pression osmotique de la solution qui baigne la préparation est augmentée (Fatt et Katz, 1952; Furshpan, 1956; Boyd et Martin, 1956; Liley, 1956a).

Cet effet est irreversible et ne semble pas être dû à la dépolarisation des terminaisons nerveuses (Blioch, Glagoleva, Liberman et Nenashev, 1968).

En effet, l'addition de 40 mM de KCl, en dépolarisant l'élément présynaptique, augmente la fréquence des miniatures mais cet effet existe aussi bien en Ringer normal qu'en milieu hyperosmotique.

Plusieurs hypothèses cherchent à rendre compte de l'augmentation de la libération spontanée d'ACh lors de l'accroissement de l'osmolarité de la solution de survie. Selon Blioch et al, (1968), les changements d'osmolarité dans la solution de Ringer modifieraient la concentration ionique au niveau des terminaisons nerveuses en influençant l'adhésion entre les vésicules synaptiques et la membrane des terminaisons. D'autres auteurs attribuent à une réduction des charges fixes de la surface des vésicules et de la face interne de l'axolemme des terminaisons nerveuses les variations de libération spontanée observées. Cette réduction faciliterait le contact des deux membranes (Bass et Moore, 1966; Remler, 1973; Van der Kloot et Kita, 1973).

Chez les batraciens, les modifications de la concentration de calcium sur la fréquence des ppmm sont moins importantes que chez les mammifères où elles sont été mises d'abord en évidence (Boyd et Martin, 1956; Liley, 1956; Hubbard, Jones et Landau, 1968a. Toutefois, la fréquence des ppmm est augmentée

par l'accroissement de la concentration en calcium du Ringer (Mambrini et Benoit, 1964; Rotshenker et Rahamimoff, 1970),et réduite mais pas supprimée en absence de calcium et en présence de EGTA. (Hubbard, Jones et Landau, 1968a; Miledi et Thies, 1967,1971

La stimulation répétitive des terminaisons nerveuses pré-synaptiques augmente la fréquence des ppmm à la jonction neuro-musculaire de mammifères (Brooks, 1956; Liley, 1956b; Hubbard, 1963) et de batraciens (Del Castillo et Katz, 1954b, Braun, Schmidt et Zimmerman, 1966; Miledi et Thies, 1971a).

Pendant les minutes qui suivent la stimulation répétitive, la fréquence des ppmm augmente linéairement avec le temps. Le degré d'augmentation est dépendant de la concentration de Ca^{2+} dans le milieu de survie (Miledi et Thies, 1971). Les ions Mg^{2+} n'ont aucun effet sur cette augmentation de fréquence (Hurlbut et al, 1971).

Lorsque le milieu de survie est dépourvu de Ca^{2+}, et contient de l'EGTA, ce qui supprime la libération de transmetteur consécutive à une stimulation nerveuse, il y a toujours une augmentation de la fréquence des ppmm. Il est possible que l'augmentation de fréquence dans des milieux de survie qui contiennent du Ca^{2+} extracellulaire soit due à la persistance d'action du Ca^{2+} ou d'un complexe de Ca entré lors de la dépolarisation nerveuse. Par contre, en absence de Ca^{2+} extracellulaire, la participation d'une population quantique qui n'a pas besoin de Ca^{2+} pour être libérée doit être envisagée.

La température influence également la fréquence des ppmm. Sur la jonction neuromusculaire de Grenouille, Fatt et Katz (1952), ont montré que la fréquence des ppmm augmente avec la

température et que le Q10 est voisin de 3 entre 8 et 25°C.

Sur la même préparation Takeuchi, (1958) en étudiant la fréquence des ppmm dans des milieux normaux et hypertoniques, a montré que les effets de la température sont semblables dans les deux conditions : le Q10 est de 4, un peu plus élevé que celui obtenu par Fatt et Katz, (1952). Chez les mammifères, la relation entre la température et la fréquence des ppmm est beaucoup plus complexe (Liley, 1956a; Li, 1958; Hubbard et al, 1971).

L'étirement du muscle de Grenouille, au-delà de sa longueur initiale, augmente de façon réversible,la fréquence des ppmm (Fatt et Katz, 1952; Hutter et Trautwein, 1956). Cet effet se manifeste même lorsque le muscle est baigné dans les milieux de survie contenant une forte concentration de Mg^{2+}, et très peu de Ca^{2+}, et en présence de Tétrodotoxine (Turkanis, 1973). Par contre sur le muscle de mammifère, cet effet ne se produit pas. Ces résultats divergents chez la Grenouille et le Rat, semblent être dûs aux différences morphologiques et d'arrangement géométrique des terminaisons nerveuses des deux espèces.

La fréquence est sensible aux variations du potentiel de membrane des terminaisons pré-synaptiques. Le passage de courants dépolarisants au moyen d'une microélectrode externe placée au voisinage de la terminaison nerveuse augmente la fréquence des ppmm (Del Castillo et Katz, 1954c Liley, 1956c). L'augmentation de la fréquence des ppmm induite par la dépolarisation dépend de la concentration de Ca^{2+}; elle est inhibée par les ions Mg^{2+} (Liley, 1956 , Del Castillo et Katz, 1954c; Hubbard, 1961; Landau, 1969).

Des travaux récents sur la jonction neuromusculaire de mammifère ont montré que la fréquence des ppmm augmente d'un

facteur 10 pour chaque dépolarisation focale de 15 à 18 mV (Cooke et Quastel, 1973a). L'augmentation de la concentration de K^+ dans le milieu de survie des jonctions neuromusculaires de batracien et de mammifère provoque une augmentation de la fréquence des ppmm. Cet effet du K^+ a été attribué à la dépolarisation pré-synaptique (Liley, 1956c), qui, par elle-même, accroît cette fréquence (Del Castillo et Katz, 1954). Cependant, plusieurs observations font penser que l'effet du K^+ n'est pas lié seulement à une dépolarisation des terminaisons. Liley et North, (1953), et Takeuchi, (1961) ont observé une augmentation de l'amplitude du ppm et du cpm lors de l'augmentation de la concentration de K^+, or la dépolarisation de ces terminaisons par des courants électriques, entraîne des actions opposées, (Takeuchi, 1961; Hubbard et Willis, 1968). De plus, l'effet du K^+ sur la fréquence des ppmm comporte deux phases : l'une, rapide, dure quelques minutes, l'autre se développe beaucoup plus tardivement (environ 30 minutes; Gage et Quastel, 1965b).

Certaines substances exercent une action directe sur la fréquence de libération des quanta indépendamment du potentiel de membrane des terminaisons nerveuses ou de la concentration en Ca^{2+} extracellulaire. Il s'agit de l'éthanol et d'autres alcools par exemple (Gage, 1965a Quastel et al, 1971). Cette observation a conduit Quastel (1974) à établir un modèle dans lequel la probabilité de libération dépendrait "d'un nombre local d'activateu mais, d'autres interprétations peuvent être proposées, en particuli l'existence de différents systèmes de libération spontanée de quanta.

OBJECTIFS EXPERIMENTAUX

Des données de la littérature ont suggéré que les mécanismes qui contrôlent la libération spontanée et évoquée de transmetteur, sont modifiés par les variations de pH extracellulaire.

Cependant, jusqu'ici, le problème n'a pas été abordé de façon systématique et les résultats obtenus ne permettent guère de comprendre les effets du pH sur la libération de transmetteur. C'est pour cela que nous nous sommes proposés d'aborder cette étude. En appliquant les méthodes de potentiel imposé et de dérivation focale, nous allons étudier les effets des changements de pH dans le milieu de survie sur la libération de transmetteur d'une part, et sur le cours temporel du courant synaptique d'autre part. Ce dernier aspect nous a paru susceptible de fournir des données nouvelles sur les processus qui contrôlent l'interaction ACh Récepteur.

MATERIEL ET METHODES :

a - Préparation neuromusculaire :

Toutes les expériences ont été faites sur la jonction neuromusculaire de grenouille (Rana Esculenta). Le muscle utilisé a été le couturier (sartorius)en raison de sa structure plate et de la présence d'une couche monocellulaire de fibres sur les bords de la préparation. Les animaux ont été maintenus jusqu'à leur utilisation dans un vivarium à température constante (20°C), ils ont été nourris individuellement au moins deux fois par semaine.

b - Installation de la préparation :

Une fois que le muscle couturier et son nerf ont été dissèqués, ils sont placés dans la chambre d'expérimentation, récipient en plexiglass dont le fond est revêtu de rhodorsil taillé en forme convexe. Le muscle est fixé sur ce support, la face interne tournée vers le haut, par le tendon tibial, l'aponévrose pelvienne et les lanières de tissu conjonctif latéral à l'aide de "mini" épingles. Le volume réduit de la chambre d'expérimentation (6 ml) permet au milieu qui baigne la préparation d'être renouvelé constamment par perfusion. Un robinet à quatre voies permet de changer rapidement les solutions, la vitesse de circulation du flux peut être réglée graduellement jusqu'à 20 ml/min.

c - Dispositif expérimental :

Le dispositif général que nous avons étudié dans nos expériences et schématisé dans la figure 4 va être décrit séparément avec tous ses éléments.

Microélectrodes pour enregistrement intracellulaire (E_2) et passage du courant (E_1).

Nous avons utilisé des microélectrodes dont le diamètre

à l'extrêmité est inférieur au micron. Ces microélectrodes sont étirées à partir du tube de verre pyrex de 1 mm ou 1,5 mm de diamètre extérieur, à l'aide d'une machine automatique D. Kopf. Elles sont remplies d'une solution de KCl (3M) ou de citrate de potassium (2M), soit par ébullition sous vide, soit par simple diffusion. Etant donné que le potentiel de pointe des microélectrodes augmente à mesure qu'elles vieillissent (Adrian, 1956; Ito et Oshima, 1964; Lévine, 1966) les microélectrodes ont été faites avant chaque expérience et n'ont pas été gardées longtemps après le remplissage. Les microélectrodes ont été sélectionnées de façon à ce que leur résistance soit comprise entre 2 et 10 méghoms et que leur potentiel de pointe mesuré dans le Ringer ne dépasse pas quèlques mV pour réduire le potentiel d'extrêmité, il a été occasionnellement fait usage du procédé décrit par Waan et Goldsmith, 1972; Riemer et al, 1974, consistant à amener au pH acide (2, 3) les solutions remplissant les microélectrodes.

Microélectrodes pour enregistrements extracellulaires :

Nous avons utilisé des microélectrodes dont le diamètre à la pointe est de quelques microns, remplies avec une solution de NaCl 0,5 M par centrifugation (environ à 600 tours mn^{-1}). La résistance des microélectrodes est faible, voisine du méghom.

Microélectrodes servant à l'application ionophorétique extracellulaire d'ACh (E_3) :

Pour les applications ionophorétiques d'ACh, nous avons utilisé des microélectrodes étirées à partir d'un tube de verre dans lequel est introduit au préalable de la laine de verre ou un tube capillaire. Les électrodes sont remplies d'une solution d'ACh 2 M. Ceci permet d'obtenir des résistances assez élevées de l'ordre de 60 à 120 méghoms qui permettent de réduire au maximum la désensibilisation

des récepteurs due à une fuite d'ACh (Peper et McMahan, 1972; Dreyer et Peper, 1974).

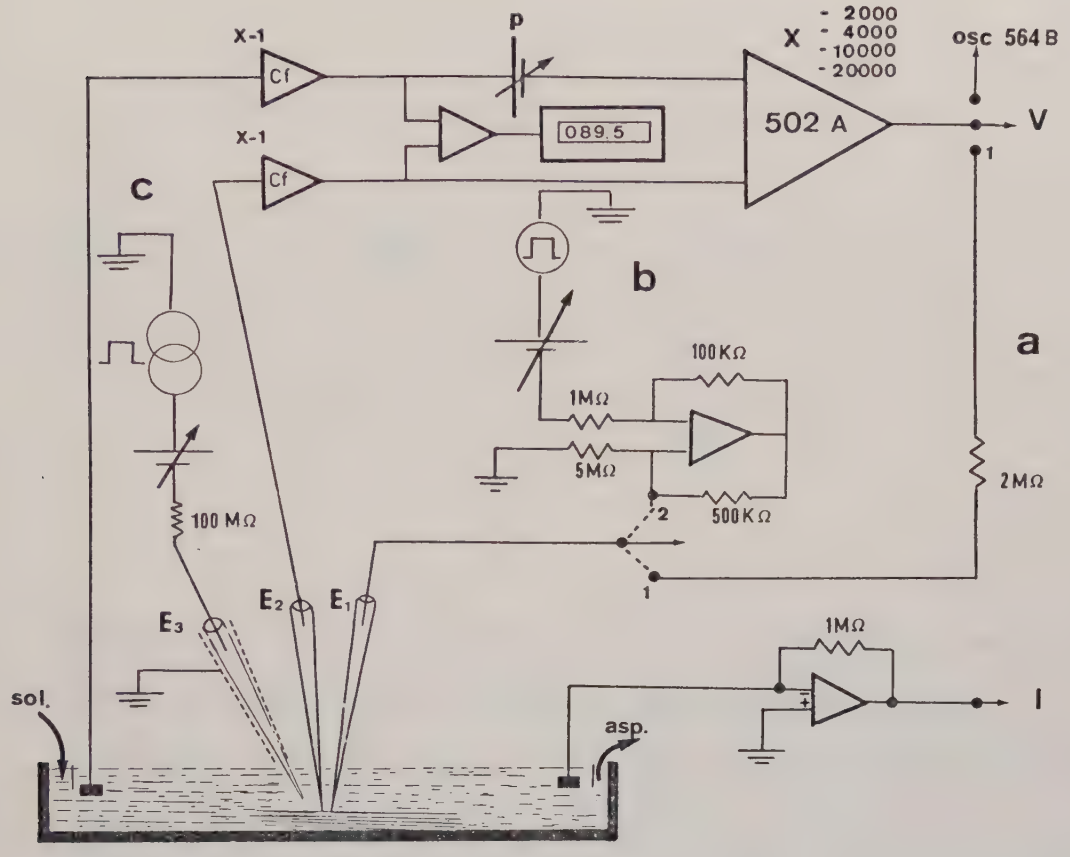


FIG.4

Schéma du dispositif expérimental utilisé.

E_1 et E_2 représentent les microélectrodes intracellulaires.

E_3 : micropipette pour l'application ionophorétique d'ACh commandée par le circuit C

Cf : changeur d'impédance

p : source de tension calibrée

I : système de mesure du courant

b : circuit permettant de travailler en courant constant (lors de la fermeture de l'interrupteur en position 2)

a : circuit permettant de travailler en potentiel imposé (par la fermeture des interrupteurs en position 1)

Pour les détails de la légende, se référer au texte.

Calibration des microélectrodes :

Le circuit permettant de calibrer les microélectrodes apparaît dans la fig.5.

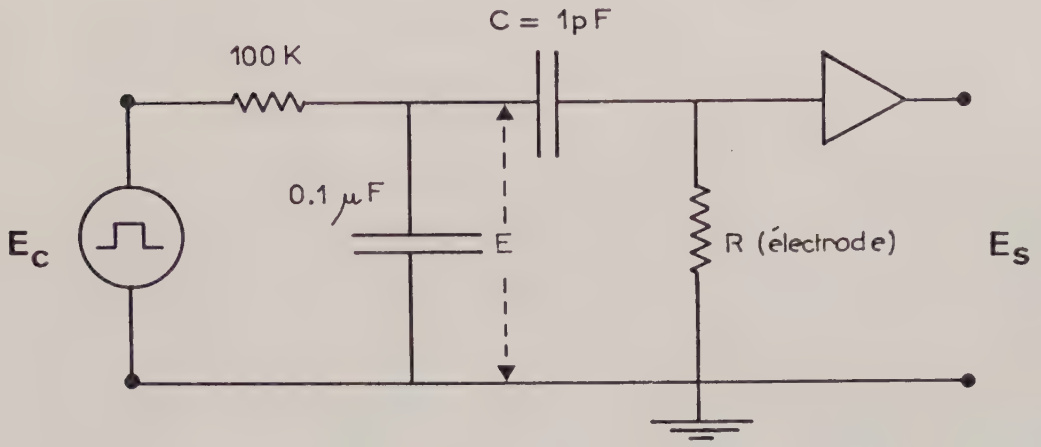


Fig. 5 : Dans ce circuit, E_c provient du générateur de signaux carrés de l'oscilloscope Tektronix type 502 A (calibreur).
La fréquence de son signal est de 1 KHz. Ce circuit est décrit par l'équation : $Ec = E_s\ RC\ (1 - e^{-t/RC})$
si $RC \ll t$, alors $e^{-t/RC} \simeq 0$

Comme E_c et C sont des valeurs fixes, R est donc proportionnel à E_s.

Electrode de référence :

Elle est constituée d'une pastille de chlorure d'argent qui plonge dans la chambre d'expérimentation, reliée par un fil d'argent à un changeur d'impédance, ce qui évite toute fuite de courant pour cette voie.

Source de tension calibrée : (p)

Une source de tension calibrée de 0 à $\pm$ 220 mV par paliers de 1 et de 10 mV est utilisée pour compenser le potentiel de repos de la cellule. Elle permet aussi d'imposer un potentiel donné

lorsqu'on utilise la technique du potentiel imposé. Elle est reliée d'une part à l'électrode de référence et d'autre part à l'entrée + de l'oscilloscope. Un voltmètre digital relié entre la référence et la sortie du changeur d'impédance de dérivation permet de lire en permanence le potentiel de membrane.

Source de courant constant :

Ce système est représenté dans le circuit de la fig.4 par b. Il permet d'injecter un courant proportionnel au voltage appliqué sans être affecté par les résistances de charge (essentiellement celle de la microélectrode).

Quand le système n'est pas en service, la sortie de l'amplificateur opérationnel est mise à la masse à travers une résistance. Cette source de courant constant est alimentée soit par une pile variable, soit par un circuit de stimulation électronique.

Electrode de succion pour la stimulation du nerf :

Nous avons utilisé un tube de verre d'environ 3 mm de diamètre externe, étiré pour obtenir un diamètre correspondant à celui du nerf. Un fil d'argent chloruré entoure l'électrode. D'une part, il est connecté à une voie d'une unité d'isolement et d'autre part connecté par un fil d'argent chloruré qui plonge dans le Ringer de l'intérieur de l'électrode au voisinage du nerf, ce qui permet la stimulation de la préparation.

Stimulation de la préparation :

Pour obtenir des cpm, le nerf du muscle couturier est stimulé supramaximalement à fréquences constantes de 0,2 à 1 Hertz par des courants rectangulaires de 0,05 msec. à 1 msec.de durée, à l'aide d'un stimulateur électronique à faible impédance muni d'une unité d'isolement.

Applications ionophorétiques : (c)

Elles ont été réalisées grâce à des "chocs" de 2 à 20 ms qui commandent des relais électromagnétiques. Une pile variable fournit le courant de freinage voulu (< 10 nA).

d - Technique du potentiel imposé : (voltage clamp)

Cette technique a été décrite par Hodgkin, Huxley et Katz (1949) pour l'axone géant de calmar; elle a été utilisée sur la plaque motrice pour la première fois par Takeuchi et Takeuchi, 1959. Le principe consiste à mesurer le potentiel de membrane par une micro-électrode et à injecter par une deuxième, un courant fourni par un amplificateur différentiel dont les deux entrées sont l'une au potentiel intracellulaire et l'autre au potentiel que l'on veut imposer. L'amplificateur différentiel débitera du courant dans la cellule jusqu'à ce que les deux entrées soient au même potentiel c.à.d. jusqu'à ce que le potentiel intra-cellulaire soit égal au potentiel imposé. L'amplificateur différentiel que nous avons utilisé est un des canaux de l'oscilloscope Tektronix 502 A. Le potentiel imposé provient de la source de voltage calibré placé en série entre le changeur d'impédance de l'électrode de référence et l'entrée positive de l'oscilloscope (le potentiel de membrane sur l'entrée -, signal inversé pour la nécessité de la boucle de rétro-action). Une résistance en série de 1 MΩ dans la boucle de rétro-action sert à amortir les oscillations du système.

Enregistrements des courants synaptiques :

La jonction neuromusculaire est localisée par approximation successives à l'aide d'une microélectrode mobile dont l'emplacement définitif est fixé au point où l'amplitude et la vitesse de la phase ascendante du potentiel synaptique sont maximum. Une seconde micro-

électrode est alors placée dans la même fibre musculaire à environ 50 µm de l'électrode de dérivation. Le potentiel de membrane obtenu en différentiel par rapport à l'électrode de référence est compensé à l'aide d'une source de tension calibrée qui permet d'établir le potentiel que l'on veut imposer lorsque l'on boucle le circuit a de la fig. 4 au moyen des interrupteurs en position 1. La mesure du courant nécessaire à imposer un potentiel de membrane donné est contrôlé tout au long de l'expérience.

Limitations de la technique du potentiel imposé :

Une des principales limitations dans la technique du potentiel imposé est déterminée par la relativement large extension de la plaque motrice qui peut dans le cas particulier de la grenouille atteindre jusqu'à 400 µm (Kuhne, 1887; Miledi et Potter, 1971; Kuno, Turkanis et Weakly, 1971). Ceci implique qu'on ne peut pas avoir un contrôle du voltage de façon uniforme sur toute la longueur de la plaque; ainsi le voltage diminuera de façon exponentielle avec la distanc existant à partir du point auquel le courant est appliqué. En utilisant les équations de Hodgkin et Rushton, 1949, on peut calculer qu'à 100 µm de la zone d'injection du courant, le potentiel imposé, mesuré à partir du potentiel de repos sera réduit de 5% et à 200 µm de 10%. Dans ces conditions, le courant mesuré ne sera pas une réflexion précise du changement de conductance. Toutefois, on peut arriver à imposer un contrôle presque parfait et uniforme du potentiel, dans le cas où l'extension de la plaque représente une petite portion de la constante d'espace de la fibre (1,9 mm en moyenne). D'autres facteurs limitants proviennent des interactions capacitives entre les micro-électrodes d'une part et les capacités parasites dues aux différents blindages, ce qui impose une constante de temps au système enregistrement/injection du courant à la cellule de l'ordre de 100 µsec.

De ce fait, le courant nécessaire à imposer le potentiel de membrane n'est pas instantané. Cependant, si l'on veut réduire la constante de temps du système , le circuit se met à osciller (d'où la nécessité d'une résistance de 1 à 2 méghoms en série à la sortie de l'amplificateur). Une mauvaise localisation des électrodes par rapport à la plaque motrice, ainsi que l'augmentation de distance entre les microélectrodes du voltage et du courant, se traduisent par une diminution d'amplitude et un allongement du courant synaptique (Auerbach et Betz, 1971, Magleby et Stevens, 1972a).

Une autre source d'erreur possible est due à l'emploi d'un gain insuffisant de l'amplificateur différentiel utilisé pour le potentiel imposé. Ainsi, comme le montre la fig.6, lorsque le gain est maximum (10.000 ou 20.000), la variation maximale du potentiel de membrane par rapport au potentiel imposé pendant un cpm est d'environ 0,1 à 0,2%. Mais, si le gain est réduit à 2.000 par exemple, une différence d'environ 5% apparaît et ceci se traduit comme l'ont montré Magleby et Stevens (1972a) à un ralentissement du cours temporel du courant synaptique.

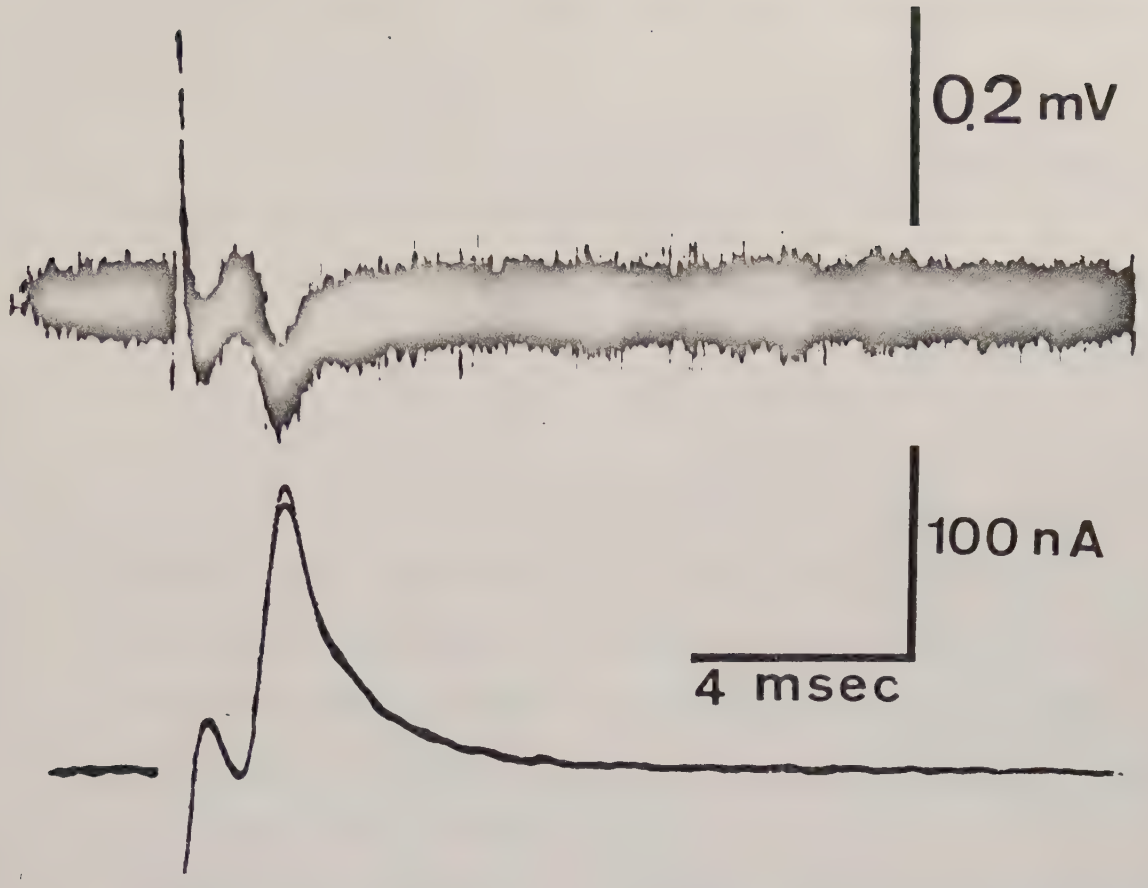


Fig. 6 La figure montre dans le tracé supérieur, les variations du potentiel de membrane imposé (-100 mV), pendant l'activité synaptique (tracé inférie gain de l'amplificateur 20.000.

e - Enregistrement focal par microélectrode extracellulaire :

Cette technique a été décrite par Del Castillo et Katz (1956) et utilisée postérieurement par Dudel et Kuffler (1961), Katz et Miledi (1965, 1967, 1972).

Elle consiste à recueillir sélectivement au moyen d'une microélectrode extracellulaire de faible résistance en certains points de la jonction neuromusculaire "les courants de plaque motrice externes". Cette technique extrêmement sélective ne permet de recueillir que l'activité synaptique se produisant à moins de 40 µm de la pointe de la microélectrode; par approximations successives la microélectrode

peut être placée au voisinage immédiat de la terminaison nerveuse.

f - Solution de Ringer :

Nous avons utilisé une solution de Ringer ayant la composition suivante exprimée en mM/l.

Na^+	K^+	Ca^+	Cl^-	}
				} + système tampon
118,7	2,5	1,8	121,1	}

Le système tampon ajouté est composé de deux mM de N-acétyl-glycine (Koch-Light (R)) et de 2 mM de Tris-maléate (sigma(R)). Le pH désiré est obtenu par addition de quantités appropriées de NaOH; ce système permet d'obtenir une grande gamme de valeurs de pH. Nous avons également utilisé le système tampon-phosphate (HPO_4^{--} , $H_2PO_4^-$) à la concentration totale de 3 mM.

La composition du Ringer a été modifiée selon les besoins expérimentaux et ces modifications sont données avec les résultats.

Calcium ionisé aux différents pH :

Le calcium ionisé dans nos solutions à différents pH a été mesuré grâce à un procédé quiutilise une électrode sensible au calcium (Orion biomédical, ionized calcium analyser, Model 55-20) en conditions d'anaérobiose afin d'éviter les changements de pH dus à la perte de CO_2. Les résultats obtenus apparaissent sur le tableau 1.

T A B L E A U 1

Effets du pH sur la quantité de calcium ionisé présent dans les solutions de Ringer tamponnées avec du Tris-maléate N-acétylglycine exprimés en meq/litre : 20°C

	Ca total	Ca^{2+}	Rapport Ca^{2+}/Ca total
pH: 9,2	3,6	2,50 $\pm$ 0,01	0,69
pH: 7,2	3,6	2,90 $\pm$ 0,06	0,80
pH: 5,2	3,6	* 3,80	

* A pH 5,2, la quantité de Ca^{2+} mesurée est supérieure au Ca total à cause de l'interférence entre le Ca^{2+} et H^{+}.

R E S U L T A T S

CHAPITRE I

EFFETS DU pH SUR LA LIBERATION SPONTANEE DE L'ACh

La libération spontanée du transmetteur au niveau de la jonction neuromusculaire de mammifères et de batraciens est affectée par les changements de pH extracellulaires (Hubbard et al. 1968, a Pécot-Dechavassine, 1970), et par la température.

Nous avons voulu reprendre ces études en prenant pour critère les variations de fréquence des miniatures en fonction des changements de pH extracellulaires et à différentes températures.

Protocole expérimental :

Les cpmm ou les ppmm sont enregistrés au niveau de la plaque motrice. Dans certaines préparations, de la prostigmine a été ajoutée (5×10^{-6} M) au Ringer, tamponné aux différents pH pour augmenter l'amplitude des miniatures et faciliter leur observation. Certaines expériences ont été faites en milieu de Ringer sans Ca^{2+}, avec ou sans EGTA, d'autres avec des concentrations deux à quatre fois plus importantes de Ca^{2+}. Le K^{+} extracellulaire (0,5 mM au lieu de 2,5 mM) a été modifié dans certains cas; enfin, l'influence de la température a été étudiée. Pour cela, la température du Ringer baignant la préparation a été réglée à l'aide d'un élément à effet Peltier, connecté à une source de courant dont l'intensité permet de régler la température voulue. Cette température est mesurée à l'aide d'une thermistance placée à quelques mm du point d'enregistrement. Afin de comparer nos

résultats entre eux, nous avons déterminé le Q_{10}, c'est à dire le rapport entre la fréquence des miniatures à la température t + 10°C et la fréquence de ces miniatures à la température t°C pour une même cellule. Les températures choisies sont 20 et 10°, Cinq minutes d'équilibration sont respectées avant les enregistrements pour chaque température.

Résultats

a - Effets du pH sur la fréquence des miniatures

La fréquence des miniatures augmente lorsque la préparation est baignée par une solution de Ringer tamponnée à pH 5,2.

La fig. 7 montre un exemple du cours temporel de cette augmentation lors des premières minutes d'exposition à pH acide.

Après 6 à 8 minutes d'exposition à pH acide, on obtient un plateau de fréquences qui à pH 5,2 peut se maintenir pendant environ 60 minutes, puis diminue faiblement, la fréquence reste significativement supérieure à la fréquence à pH normal. Cette valeur de pH n'affecte pas le potentiel de membrane. Cet effet du pH acide est rapidement réversible comme le montre la fig. 7, lorsque la préparation est baignée par une solution à pH 7,2.

Les effets du pH sur la fréquence des miniatures sont encore beaucoup plus marqués lorsque le pH de la solution de Ringer est porté à 4 ou 4,5, néanmoins, il faut noter que dans ces conditions, le potentiel de membrane musculaire est dépolarisé de 15 à 20 mV. Les changements de pH du côté alcalin par contre, ne modifient pas significativement la fréquence des miniatures. Le tableau 2 montre les résultats obtenus sur 11 préparations.

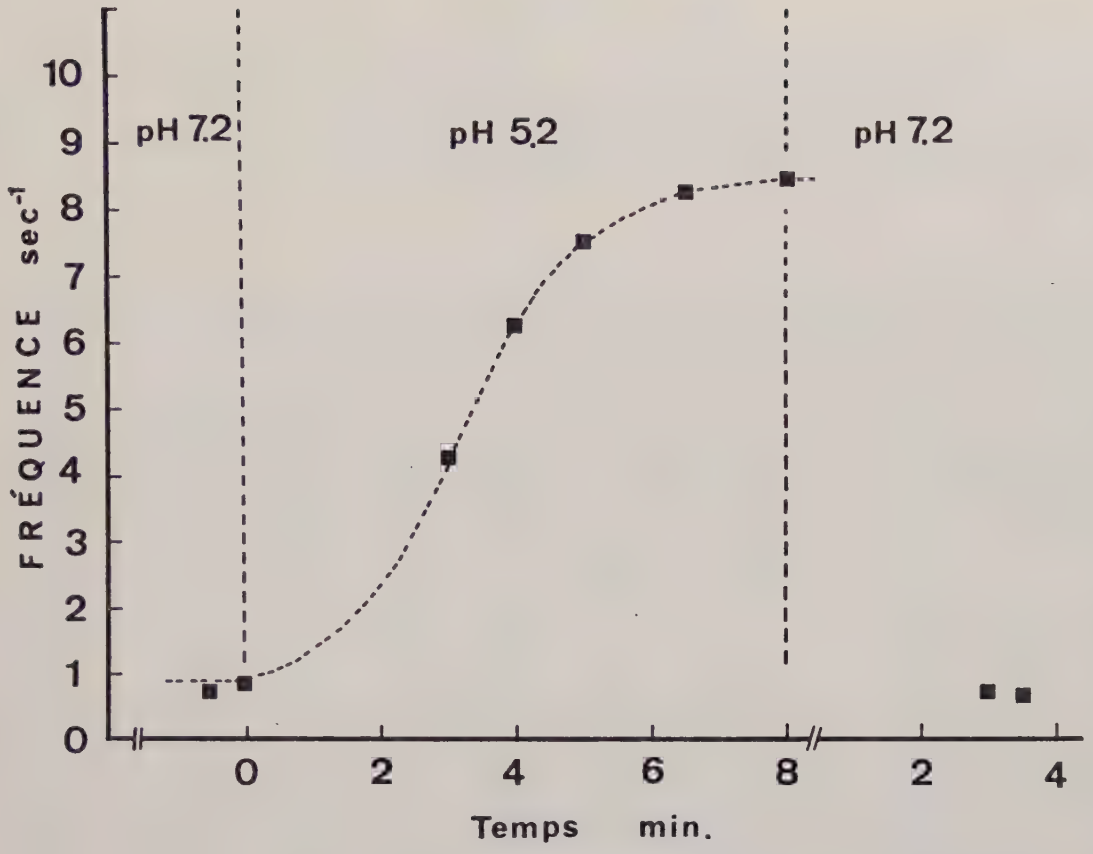


FIG.7

Changements de fréquence des courants miniature lors du changement de pH acide au temps 0. Les traits en pointillés indiquent le moment auquel le pH a été modifié. La vitesse du flux baignant la préparation est de 10 ml mn^{-1}. (Volume de la chambre = 6ml).

TABLEAU II

Variations de la fréquence moyenne des courants miniature sous l'action des changements de pH dans le milieu de survie.

Exp	Fréquence moyenne sec^{-1} °			Rapport de fréquences	
	pH = 5,2	pH = 7,2	pH = 9	pH 5,2/7,2	pH 9/7,2
1	-	0,62	0,58	-	0,93
2	3,45	0,39	-	8,84	-
3	2,95	0,46	-	6,41	-
4	-	1,33	1,38	-	1,03
5	-	2,28	2,17	-	0,95
6	2,07	0,54	0,43	3,83	0,79
7	8,33	1,14	0,90	7,30	0,79
8	8,70	1,82	1,75	4,78	0,96
9	25,2	2,71	2,84	9,31	1,04
10	8,8	-	1,56	-	-
11	17,5	-	2,03	-	-
				n = 6	n = 7
			moyenne ± écart type	$6,74 \pm 2,17$	$0,93 \pm 0,10$

° Chaque expérience a été réalisée sur un muscle différent.

b - Effets de la réduction du potassium externe sur l'augmentation de fréquence des miniatures à pH acide.

La dépolarisation des terminaisons nerveuses augmente la fréquence de la libération spontanée (Del Castillo et Katz, 1954c ; Takeuchi-Takeuchi, 1961). Celle-ci pourrait rendre compte de l'augmentation de fréquence que nous avons observée. Dans ce cas, en diminuant le potassium externe de 2,5 à 0,5 mM afin de compenser une éventuelle dépolarisation des terminaisons, pendant la période de fréquence maximale en pH acide, la fréquence des cpmm devrait retrouver ses valeurs normales. Or ce n'est pas ce que nous avons observé au cours de trois expériences. La fréquence ne s'est pas montrée différente après 15 minutes d'exposition à pH acide et potassium externe réduit. D'autre part, l'amplitude des cpmm a nettement augmenté, probablement à cause de l'augmentation du potentiel efficace (Em-Er).

c - Effets du pH acide sur la fréquence des miniatures dans un milieu de survie dont la concentration en calcium a été modifiée

Etant donné la possibilité que le pH acide augmente l'influx de calcium dans la terminaison nerveuse et par là, accélère la libération spontanée, nous avons étudié l'influence des concentrations de calcium extracellulaire sur l'augmentation de fréquence provoquée par le pH acide. Quelques expériences ont été réalisées en absence de calcium et en présence d'une concentration équimoléculaire de $MgCl_2$ (1,8 mM) afin d'éviter les problèmes d'instabilité de la membrane (Shanes, 1958). Les fréquences absolues mesurées dans ces conditions ne sont pas significativement différentes de celles obtenues en calcium normal. Afin de nous assurer de l'absence presque

totale de calcium dans le milieu de Ringer, nous avons également étudié la fréquence des miniatures dans des milieux à pH variable en absence de calcium et en ajoutant 2 mM d'EGTA et 1 mM de Mg^{2+}. Dans ces conditions, la concentration en Ca^{2+} ne peut excéder 10^{-8}M (Hubbard et al.,1968a); cette précaution étant nécessaire car, malgré l'omission du calcium dans le Ringer, de faibles quantités de ce cation (10^{-4} à 10^{-5}M) peuvent être introduites dans les solutions avec les autres sels (Frankenhaeuser, 1957). D'autre part, le muscle lui-même contient de grandes quantités de calcium, principalement dans le réticulum sarcoplasmique (Ebashi et Endo, 1968). L'ion calcium peut diffuser dans le milieu de survie au cours des premières heures qui suivent l'isolement de la préparation (Shanes et Bianchi,1959; Bianchi, 1961; Meiri et Rahamimoff, 1971). Dans nos conditions, le rapport de fréquences absolues obtenu entre les pH 5,2 et 7,2 est similaire à celui obtenu dans un milieu ionique normal, mais il faut noter que l'amplitude des miniatures et leurs fréquences absolues sont réduites après 6 heures de séjour en présence de EGTA.

L'effet opposé, c'est-à-dire l'augmentation de la concentration de calcium dans le milieu de survie a été également examiné. La fréquence des miniatures à pH acide a été mesurée en présenc de différentes concentrations de calcium extracellulaire (1,8, 3,6 et 7,2 mM). Dans ces conditions, et lorsque la fréquence est augmentée par le pH acide, aucun changement significatif de la fréquence n'est observé lorsqu'on augmente la concentration de calcium externe.

d - Influence de la température sur la libération spontanée de transmetteur aux différents pH.

A pH 7,2 et à pH 9, la réduction de température diminue la fréquence des miniatures. Le Q_{10} varie pour les deux pH entre 3 et 5,6 avec une valeur moyenne de 3,2.

A pH 5,2, par contre, l'augmentation de fréquence caractéristique n'est pas modifiée par la température. Une expérience type est montrée dans la fig.8, obtenue sur une même fibre après 20 minutes d'équilibration à chaque pH;

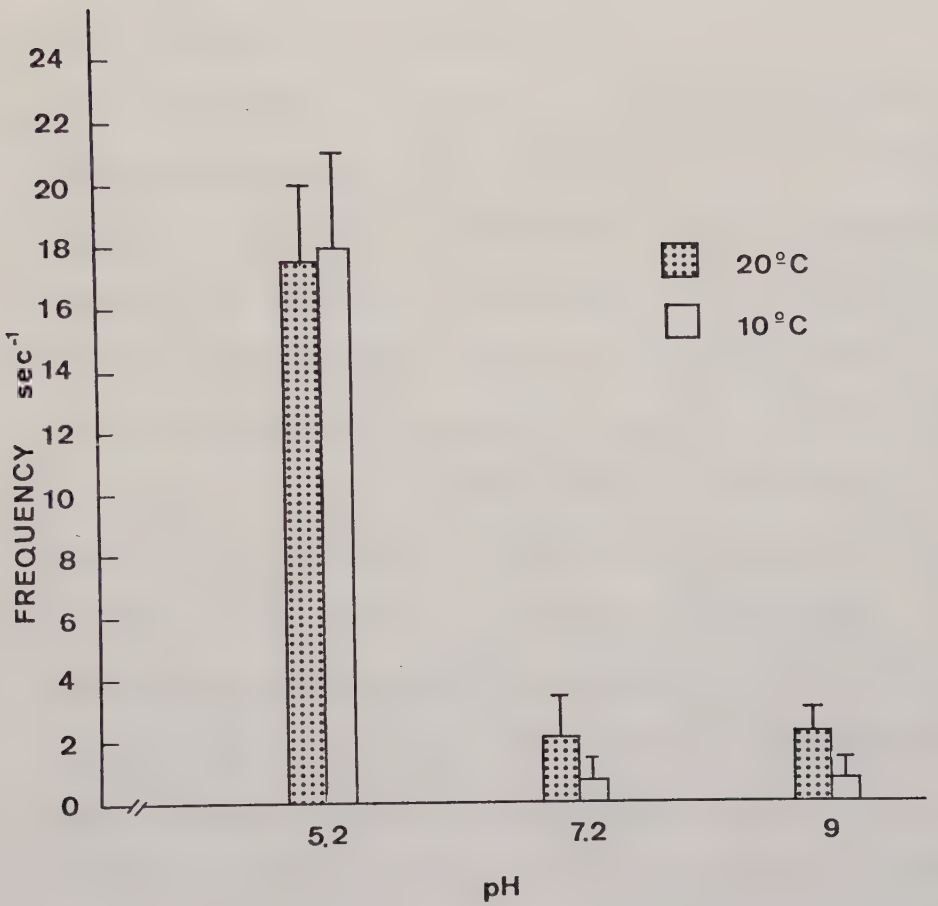


FIG.8

Effets de la température sur la fréquence des courants miniature obtenus sur la même fibre musculaire lors des changements de pH extracellulaires indiqués en abcisses. En pointillés, résultats obtenus à 20°C; les traits verticaux représentent l'écart type de la moyenne. Des effets similaires à ceux montrés dans la fig.8 ont été observés lorsque le potassium externe a été réduit de 80% (0,5 mM au lieu de 2,5 mM).

Discussion et conclusion

Nous avons observé une augmentation de la libération spontanée de transmetteur à pH 5,2 alors que le pH 9 ne la modifie pas significativement. La modification du pH des solutions baignant la préparation entraîne une faible perturbation de l'ionisation du calcium comme nous l'avons décrit auparavant. Cependant, ces variations sont faibles par rapport aux valeurs qui existent dans les milieux expérimentaux où les teneurs en calcium ont été modifiées. Nos résultats montrent que l'augmentation de la libération spontanée de transmetteur induite par le pH acide semble indépendante de la concentration extracellulaire en calcium. L'effet de la température sur la fréquence des miniatures se manifeste différemment aux pH 7,2 et 9 d'une part, et 5,2 d'autre part. A pH alcalin , un abaissement de 10°C de la température provoque une diminution de la fréquence des miniatures. A pH acide, la fréquence des miniatures n'est pas modifiée lorsque la température varie. Ces résultats sont probablement indépendants d'une action de la température sur la polarisation des terminaisons présynaptiques ou de la fibre musculaire. Ling et Woodbury (1949) sur la fibre musculaire et Hodgkin et Katz (1949) sur l'axone géant de calmar n'ont pas observé,en effet, des modifications des potentiels de repos lors des changements de température. Par ailleurs, nous venons de voir que la concentration de potassium n'influence pas l'effet du pH 5,2 quelle que soit la température. On peut formuler l'hypothèse que la libération spontanée de transmetteur dépendrait de réactions biochimiques présentant un Q_{10} élevé à pH 7 et au-dessus; tandis qu'à pH acide, on aurait un processus biophysique de nature différente.

Néanmoins, il faut noter que dans des conditions expérimentales qui accroissent davantage la fréquence des miniatures que

les nôtres (osmolarité), un Q 10 normal a été observé (Takeuchi, 1958).

Nous proposons donc une hypothèse biophysique pour expliquer nos résultats à pH acide.

Cette hypothèse fait intervenir des modifications de charge de surface dans le processus de libération d'acétylcholine (Bass et Moore, 1966; Bloch et al. 1968; Remler, 1973; Van den Kloot et Kita, 1973). En effet, la plupart des membranes biologiques possèdent des charges négatives de surface (Elul, 1967; Caméjo, Villegas Barnola et Villegas, 1969), mais également des charges négatives sur leur face interne (Chandler, Hodgkin et Meves, 1965); les vésicules synaptiques, d'autre part, placées dans un champ électrique se comportent comme des particules chargées négativement (Vos, Kuriyama et Roberts, 1968). Si les vésicules et l'axolemme possèdent des potentiels de surface de même signe, il est possible qu'il y ait une répulsion électrique de ces deux structures; nos résultats pourraient alors être expliqués par le modèle proposé par Van der Kloot et Kita (1973). Dans ce modèle, les vésicules synaptiques subissent des mouvements browniens et, celles possédant une énergie thermique suffisante pour franchir une barrière énergétique, peuvent arriver au site de libération dans la face interne de l'axolemme.

La principale composante de cette barrière est constituée par des charges fixes qui maintiennent peut être des molécules d'eau près des vésicules et des sites de libération. Si le pH du milieu extracellulaire est abaissé, l'activité des ions H^+ pourrait neutraliser la barrière énergétique et de cette façon augmenter la libération spontanée de transmetteur. Les ions H^+ pourraient, soit agir en surface, soit traverser la membrane et modifier les potentiels

de surface interne. Dans cette dernière hypothèse, le pH intracellulaire devrait se trouver modifié, ceci se produit peut être à pH 4 lorsque l'activité des ions H^+ est importante et les augmentations de fréquence nettement supérieures à celles que nous avons observées à pH 5,2. Dans nos conditions, c'est-à-dire à pH 5,2, nous pensons qu'il n'y a pas de changement important du pH intracellulaire même s'il y a passage de H^+ à l'intérieur de la membrane nerveuse terminale. En effet, des études récentes montrent que le pH interne des cellules nerveuses est très bien contrôlé, ce qui exclut un mécanisme de distribution passive des ions H^+. La membrane possède donc une pompe à H^+ ou son équivalent (Thomas, 1974; communication personnelle, 1975). Le fait que le "temps d'adhésion" entre des membranes phospholipidiques artificielles en solution aqueuse est fortement dépendant du pH (le temps d'adhésion est 6 fois plus court à pH 5 qu'à pH 7,2), Blioch et al, (1968),vient appuyer l'hypothèse d'une modification des charges de surface par les ions H^+. Ainsi, à pH 5,2, "une neutralisation" partielle des charges négatives de la face interne de la membrane provoquerait l'accroissement de la fréquence des miniatures que nous avons observées. Enfin, si les sites membranaires responsables de la barrière énergétique ont un pK acide, leur état d'ionisation n'est plus modifié au-dessus de pH 7, ce qui explique l'absence d'effet du pH 9 sur la fréquence des miniatures.

CHAPITRE II

EFFETS DU pH SUR LA QUANTITE DE MEDIATEUR LIBERE PAR LE POTENTIEL D'ACTION PRE-SYNAPTIQUE ET LA TAILLE DU QUANTUM.

a) EFFETS DU pH SUR L'AMPLITUDE DU COURANT DE PLAQUE MOTRICE (cpm)

Les effets du pH ont été étudiés sur la jonction neuromusculaire en présence de d-Tubocurarine. Il est admis que cet alcaloïde bloque la transmission neuromusculaire (Eccles, Katz et Kuffler, 1941; Kuffler, 1942) en entrant en compétition avec l'acétylcholine pour les sites récepteurs de la membrane post-synaptique (Jenkinson, 1960) et que ses effets sur l'élément nerveux sont négligeables (aux doses qui bloquent la transmission neuromusculaire (Auerbach et Betz, 1971; Yeh et Narahashi, 1974).

Protocole expérimental

Les préparations neuromusculaires ont été placées dans du Ringer normal contenant de la d-Tubocurarine (Sigma) (2×10^{-6} g/ml). Le nerf a été stimulé pendant toute la durée de l'expérience à une fréquence constante de 0,2 Hz.

Résultats

Après l'équilibration des préparations pendant une heure, en présence de d-Tubocurarine et Ringer normal tamponné à pH 7,2, les cpm ont été enregistrés. Ensuite, on a perfusé une solution de même composition maistamponnée à pH 5,2. Les changements des cpm ont été suivis pendant 20 minutes. Dans ces conditions, l'amplitude du cpm diminue progressivement jusqu'à atteindre 40 % environ de l'amplitude initiale.

D'autre part, à pH alcalin 9,2, on observe une augmentation du cpm. Ces variations d'amplitude sont réversibles par retour à pH normal. La fig.9 montre un exemple des variations de l'amplitude moyenne du cpm en fonction de différentes valeurs de pH.

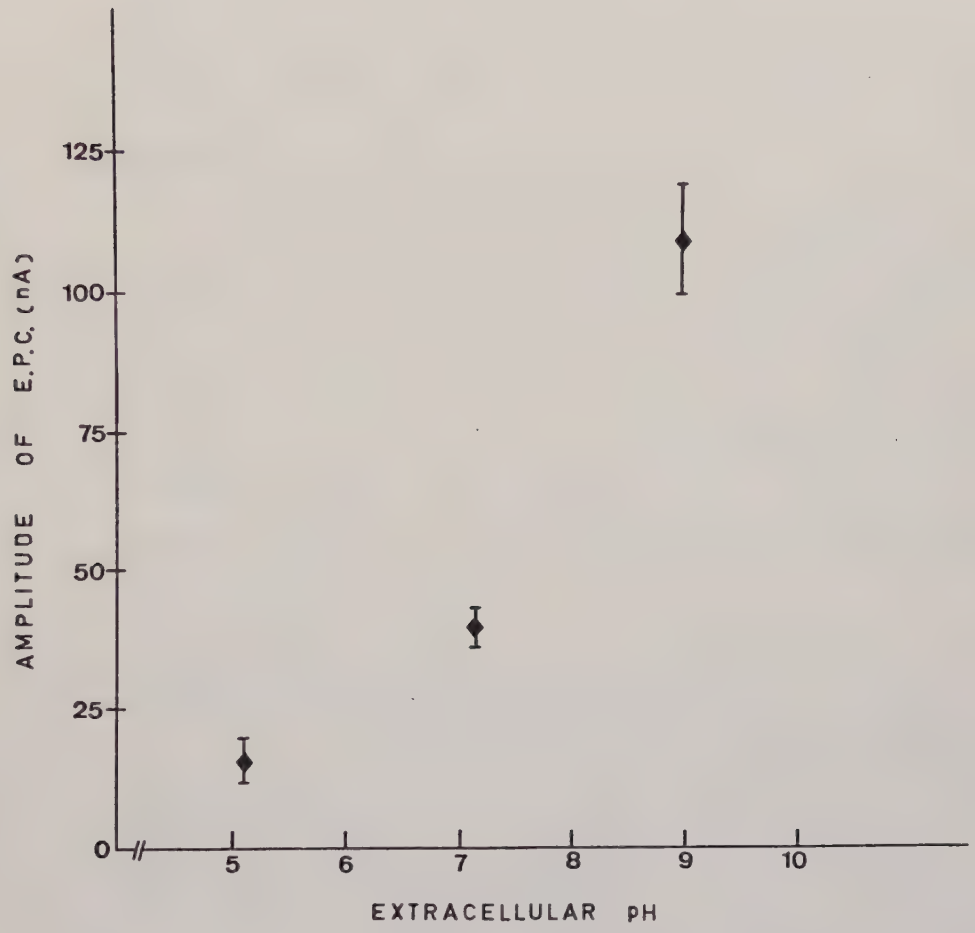


Fig.9 : Variations de l'amplitude du cpm en fonction du pH extracellulaire; transmission bloquée par addition de d-Tubocurarine 2×10^{-6} gm/ml. En abcisse, pH extracellulaire, en ordonnées, amplitud du cpm en nA mesuré après 20 minutes de perfusion à chaque pH sur une même fibre musculaire. Les traits verticaux représentent l'écart standard de la moyenne pour les deux expériences choisies (potentiel de membrane imposé à -100 mV).

Nous avons aussi constaté au cours de ces expérience que le courant nécessaire à imposer le potentiel de membrane à pH acide était diminué par rapport aux pH 7,2 et 9, effets dus à l'aug mentation de la résistance de membrane de la fibre musculaire, qui ont déjà été décrits par Del Castillo et al, 1962; Hutter et Warner 1967. Les effets du pH sont les mêmes quel que soit le tampon utilisé (système tampon phosphate ou tris-maléate N-acétylglycine).

Discussion et Conclusion

L'amplitude du cpm varie en fonction du pH de la solution qui baigne la préparation. Ce résultat peut être expliqué soit par une modification de la quantité de médiateur libéré, soit par une variation de la taille du quantum. Un éventuel effet post-synaptique ne peut être éliminé car dans le travail de Kalow, (1954), on peut remarquer que la d-Tubocurarine a une activité différente à pH acide et pH alcalin.

b) EFFETS DU pH SUR LA TAILLE DU QUANTUM.

Dans ce chapitre, nous allons examiner si l'effet du pH sur l'amplitude du cpm peut être expliqué par une variation de la taille du quantum d'ACh.

D'après de nombreux travaux, l'amplitude des cpmm est relativement constante même dans des conditions qui modifient significativement leur fréquence. Nous avons cependant recherché si elle varie en fonction du pH extracellulaire.

Protocole expérimental

Sur une même fibre musculaire, les cpmm sont mesurés en présence d'un Ringer normal, après 15 à 30 minutes à pH acide, après lavage à Ringer normal; enfin, après 15 à 30 minutes

à pH alcalin.

Afin d'obtenir des tracés ayant un bruit de fond faible, les électrodes ont été soigneusement choisies. De la prostigmine a été ajoutée (5×10^{-6} M) dans nos expériences, afin d'augmenter l'amplitude des cpmm. Etant donné que l'amplitude des cpmm dépend du potentiel imposé à la membrane, nous avons étudié les cpmm à un même potentiel dans toutes les expériences.

Résultats

Le tableau 3 montre que dans nos conditions expérimentales, aucun changement significatif de l'amplitude des cpmm n'est décelable en fonction du pH.

La distribution des amplitudes est normale avec valeur modale d'environ 5 nA.(cf. fig. 10) avec un coefficient de variation de 0,17 $\pm$ 0,03 pour le pH acide, de 0, 18 $\pm$ 0,04 pour le pH 7,2 et de 0,17 $\pm$ 0,03 pour le pH 9.

L'amplitude des cpmm peut être exprimée également par la valeur de la conductance de shunt (gs). Cette valeur a été calculée par la formule suivante :

$$(gs = \frac{P}{(Vi-Er)}) \qquad \text{où}$$

Vi = Voltage imposé
Er = potentiel d'inversion
P = amplitude aux pic du cpmm.

Les valeurs obtenues sur 5 fibres desdits muscles en prenant Er = 0 et (Vi-Er) = 100 mV donnent un changement de conductance de $5,35 \pm 0,76 \times 10^{-8}$ mho pour le pH 5,2

$5,17 \pm 0,65 \times 10^{-8}$ mho pour le pH 7,2

$5,24 \pm 1,07 \times 10^{-8}$ mho pour le pH 9.

Ces valeurs ne diffèrent pas significativement entre elles.

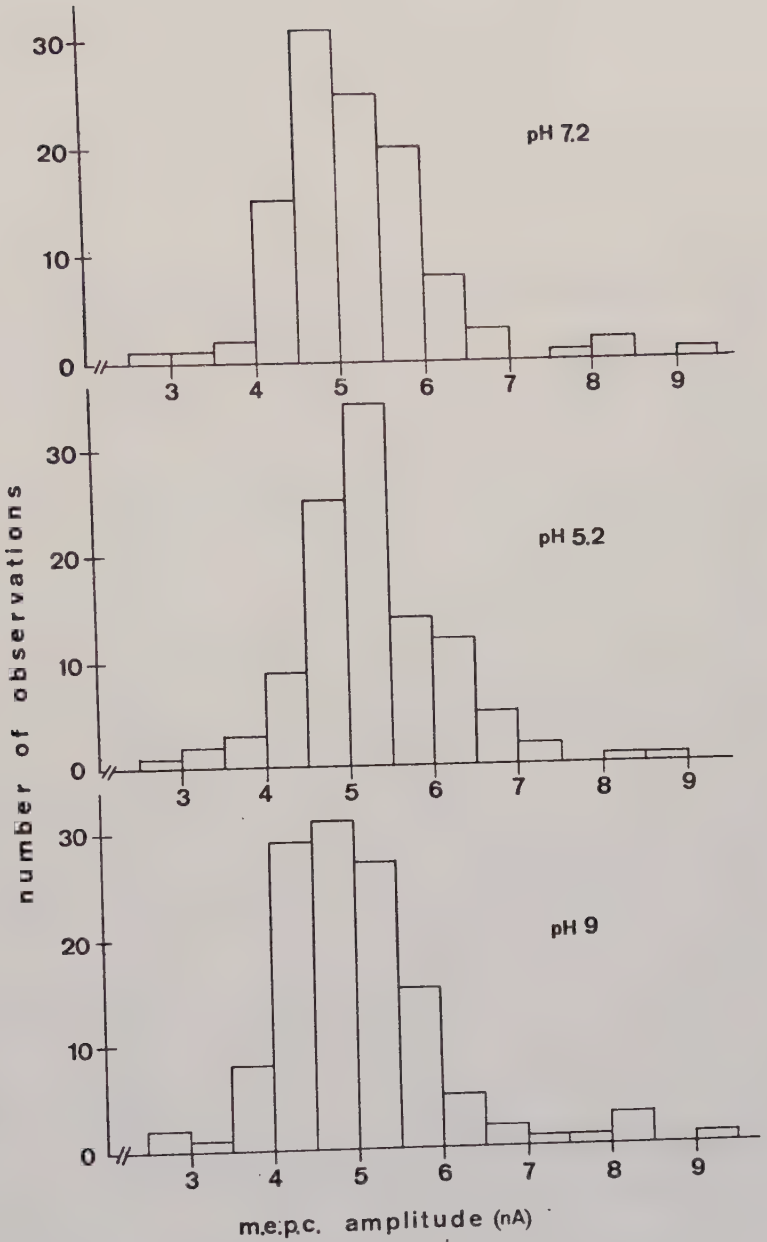


Fig. 10 : Distribution des amplitudes des cpmm aux 3 pH étudiés dans une même cellule, potentiel de membrane imposé à -100 mV.

T A B L E A U III

Amplitude des courants miniatures en nA (± écart type), sous l'action des changements du pH dans le milieu extracellulaire (entre parenthèses, nombre de mesures).

Expériences	pH = 5,2	pH = 7,2	pH = 9,2
1	5,31 ± 0,88 (262)	5,29 ± 1,15 (106)	5,03 ± 1,04 (122
2	4,75 ± 0,70 (190)	4,75 ± 1,08 (173)	
3	4,63 ± 0,80 (185)	4,48 ± 0,59 (133)	
4	6,43 ± 1,34 (119)		6,87 ± 1,05 (119
5	6,54 ± 0,81 (147)	6,22 ± 1,19 (147)	
6		4,86 ± 0,79 (120)	4,76 ± 0,65 (159
7	5,53 ± 0,90 (80)	5,12 ± 0,68 (80)	5,55 ± 1,14 (80)
8 ★	3,78 ± 0,73 (40)	3,85 ± 0,69 (40)	3,75 ± 0,53 (40)

Chaque expérience a été réalisée sur un muscle différent, potentiel imposé à 100 mV. De la prostigmine ($5,10^{-6}$M) a été ajoutée dans le bain sauf dans l'expérience marquée(★).

Discussion et Conclusion

Nos résultats montrent que la taille du quantum est remarquablement constante dans un milieu ionique normal dont le pH a été modifié dans une gamme comprise entre 5,2 et 9.

De même, la distribution d'amplitude n'est pas significativement modifiée. Les calculs de la résistance de shunt au pic du cpm, sont d'environ 19 MΩ, valeurs similaires à celles obtenues par Gage et Armstrong, (1968) et Gage et Mc Burney (1972).

c) EFFETS DU pH SUR LE CONTENU QUANTIQUE MOYEN DU CPM.

Les variations d'amplitude du cpm en fonction du pH pourraient être causées par des variations du contenu quantique des réponses. Lorsque la transmission neuromusculaire est bloquée par l'appauvrissement de la solution de Ringer en calcium, ou en additionnant du magnésium ou encore par une combinaison de ces deux méthodes (Del Castillo et Katz, 1954[a]),le nombre de quanta d'ACh libérés au cours d'une série de stimulations permet d'être calculé par les relations statistiques basées sur une distribution de Poisson (Del Castillo et Katz, 1954[a]), ou binominale (Wernig, 1975a et b). Dans ce chapitre nous avons étudié les effets du pH sur le contenu quantique du cpm.

Protocole experimental

Les préparations ont été équilibrées dans une solution Ringer, à laquelle on a ajouté du magnésium (9, 14 mM) et on a réduit le calcium (1,4 à 1,6mM). L'osmolarité est maintenue constante. Les préparations ont été stimulées supramaximalement à une fréquence de 0,2 Hz pendant toute la durée de l'expérience.

Un nombre de 50 à 100 réponses à la stimulation a été utilisé pour calculer le contenu quantique à chaque pH.

Résultats

Le contenu quantique (m) déterminé par la méthode directe (rapport entre l'amplitude moyenne des cpm/amplitude moyenne des cpmm) diminue lorsqu'on abaisse le pH de 7,2 à 5,2 d'environ 43 % en moyenne. Par contre, le pH 9 détermine une augmentation de m d'environ 80 % par rapport à pH 7,2.

La figure 11 montre un exemple des valeurs de m calculées par la méthode directe (triangle noir) et à partir du premier terme des séries de probabilité de Poisson (m : ln nombre de stimulations/nombre d'échecs),(triangles blancs)en fonction du pH. Lorsque les valeurs de m sont inférieures à 4, les résultats de deux méthodes coïncident.

Ces effets du pH ont été observés sur toutes les préparations étudiées. Après un passage à pH acide, pendant 20 à 30 minutes, le retour du contenu quantique à sa valeur initiale à pH 5,2 est obtenu beaucoup plus lentement qu'après passage à pH alcalin. Dans certaines expériences, nous avons constaté après plus d'une heure de pH 5,2 un blockage presque complet de la transmission. Un séjour prolongé en pH acide (30 minutes ou plus,) entraîne la prolongation de l'intervalle qui sépare l'artefact de stimulation du nerf du début du cpm. Ce délai comprend le temps de conduction dans le nerf et le délai synaptique,et est augmenté en moyenne de 39 % (six expériences), lors de 30 minutes d'exposition à pH 5,2.

Cet effet peut être attribué essentiellement à l'augmentation du temps de conduction de la fibre nerveuse car le délai

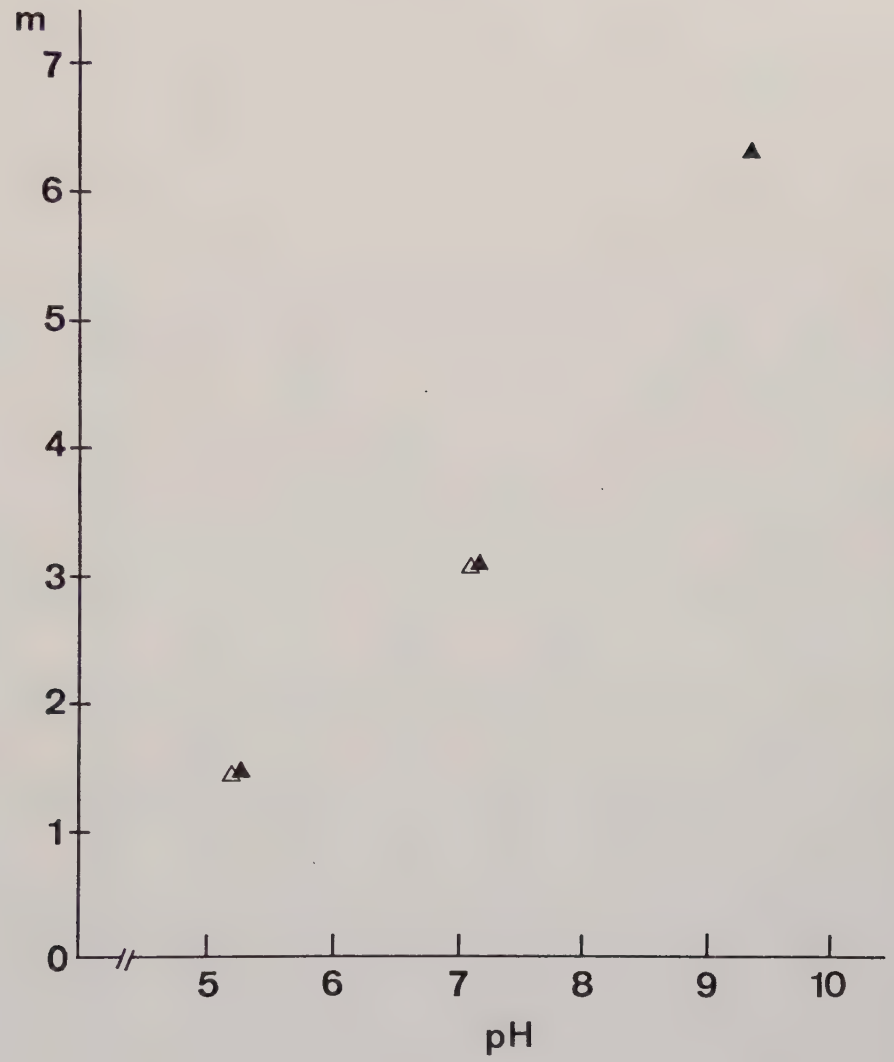


Fig. 11 : Effets du pH sur le contenu quantique moyen du cpm enregistrés sur la même fibre musculaire.

▲ = valeur de m calculée par la méthode directe

Δ = valeur de m calculée à partir du nombre d'échecs

Le tableau 4 montre les résultats obtenus sur 7 préparations différentes où m a été calculé par la méthode directe.

TABLEAU 4

Estimation du contenu quantique moyen du cpm à différents pH extracellulaires

Exp.	pH = 5.2	pH = 7.2	pH =9	$m_{pH\ 5.2}/m_{pH\ 7.2}$	$m_{pH\ 9}/m_{pH\ 7.2}$
1	1.46	3.06	6.35	0.47	2.07
2	7.51	16.70	23.90	0.45	1.43
3	2.09	6.03	10.14	0.34	1.68
4	1.51	3.80		0.39	
5	1.29	2.34		0.55	
6	2.32	5.92		0.39	
7		10.30	19.90		1.93
moyenne ± écart type				0.43 ± 0,07	1.78 ± 0.2

Chaque expérience a été faite sur une même fibre.

synaptique minimum sur deux préparations qui ont été étudiées au moyen de micro-électrodes externes, a montré des valeurs qui ne diffèrent pas significativement de la valeur normale.

Au cours des expériences, nous avons constaté que l'effet du pH acide sur le contenu quantique peut être antagonisé en augmentant la concentration de calcium extracellulaire. Une de ces expériences, dans laquelle la concentration de calcium a été doublée à pH 5,2 est montrée dans la fig. 12

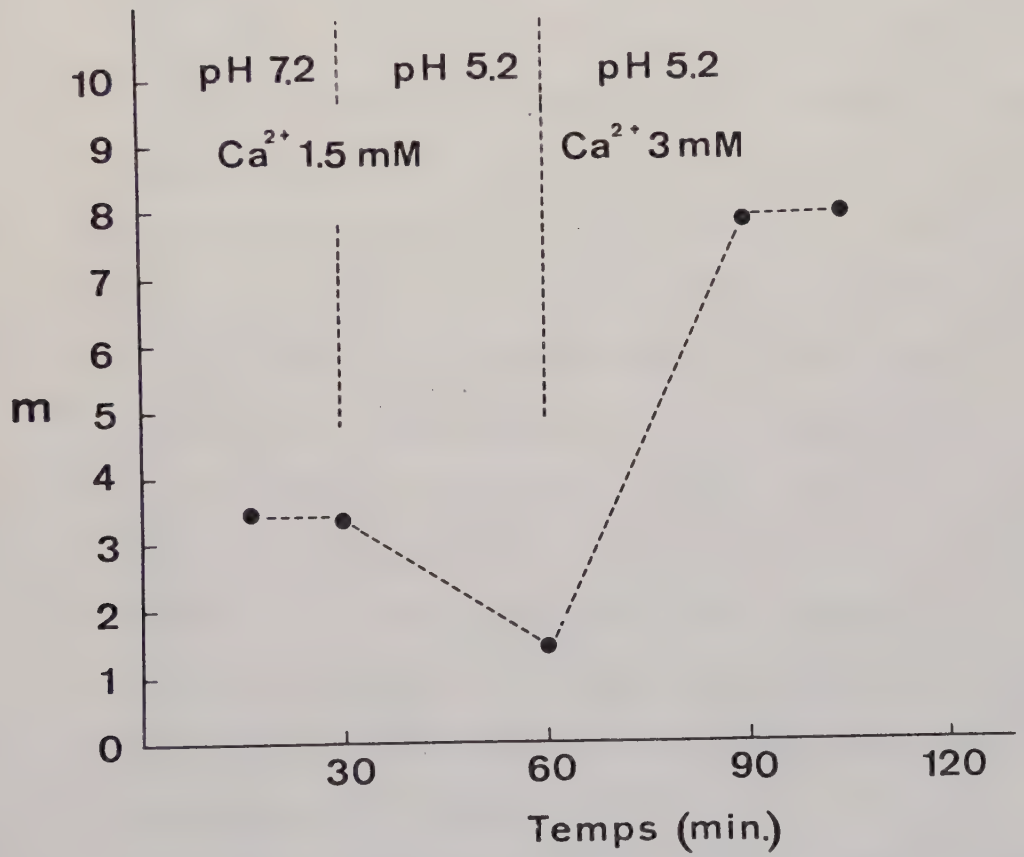


Fig. 12 : Effets du calcium sur le contenu quantique du cmp (m)
Les traits verticaux indiquent les temps pendant lesquels les solutions baignant la préparation ont été modifiées.

Discussion et conclusion

Nos résultats montrent que le contenu quantique diminue lorsque le pH est abaissé de 9 à 5,2, ce qui confirme les observations faites par Benoit et Hemley,(1974), sur une gamme de pH plus restreinte, et permettent d'expliquer les variations d'amplitude du cpm que nous avons observées à la jonction curarisée.

Puisque la taille du quantum n'est pas modifiée, les changements d'amplitude du cpm proviennent donc de variations du contenu quantique des réponses. Dans la succession de phénomènes aboutissant à la libération évoquée du transmetteur, le potentiel d'action pré-synaptique joue un rôle prépondérant. On peut penser que les modifications des valeurs de m à pH acide peuvent être dues à une action du pH sur les terminaisons de telle manière que le potentiel d'action soit bloqué au niveau des terminaisons. Néanmoins, si cela était le cas, dans une série de stimulations, le nombre d'échecs à la transmission devrait être supérieur à celui prédit par les méthodes statistiques utilisées (Del Castillo et Katz, 1954[a]; Krnjevic et Miledi, 1959). En dépit du fait que la latence entre le stimulus et le courant synaptique soit augmentée, il ne semble pas y avoir de blocage partiel dans les terminaisons; il faut noter qu'un effet similaire est obtenu lorsque le calcium est réduit (Frankenhaeuser et Hodgkin , 1957).

Un courant calcique entrant, associé au potentiel d'action du nerf a été décrit dans certaines préparations (Baker, Hodgkin et Ridgway, 1971, Baker, 1972).

Les modifications de durée et d'amplitude du potentiel d'action pré-synaptique modifient la quantité du transmetteur libéré (Katz et Miledi, 1967a; Benoit et Mambrini, 1970; Lemeignan, 1975). Il est possible que ce soit là une des causes responsables des variations du contenu quantique en fonction du pH. En effet, des études faites sur l'axone géant de Calmar, montrent que la réduction d'amplitude du potentiel d'action est d'environ 10 % lorsque le pH est abaissé à 5,5 et qu'il y a augmentation à pH alcalin (Spyropoulos, 1960). Des études plus récentes, effectuées sur le noeud de Ranvier et l'axone d'Ecrevisse (Hille, 1968, Drouin et The, 1969; Shrager, 1974), montrent des réductions des courants sodique et potassique à pH acide.

La présence de calcium est indispensable à la libération d'ACh par l'influx nerveux (Del Castillo et Stark, 1952; Del Castillo et Katz, 1954; Katz et Miledi, 1965c, 1967). Etant donné que les effets du pH acide peuvent être antagonisés par le calcium, la possibilité que les H^+ entrent en compétition avec le calcium pour certains sites de la membrane pré-synaptique doit être envisagée. En effet, Nachshen et Landau, (1974) ont communiqué que cet effet du H^+ peut être compensé par l'addition de Ca^{2+}, mais pas par d'autres cations bivalents, ce qui semble exclure un simple effet de "neutralisation" de charges de surface.

CHAPITRE III

EFFETS DU pH SUR LE COURS TEMPOREL DU COURANT SYNAPTIQUE.

a) EFFETS DU pH SUR LE COURS TEMPOREL DU COURANT DE PLAQUE MOTRICE.

Si le potentiel de membrane est maintenu par la technique du potentiel imposé pendant la transmission neuromusculaire, le cours temporel du changement de conductance post-synaptique induit par le transmetteur peut être étudié en enregistrant le courant de plaque motrice.

L'analyse de ce cours montre qu'il est constitué de deux parties principales : - d'une phase ascendante, d'un sommet et d'une phase décroissante, celle-ci comprenant une partie non exponentielle et une partie exponentielle.

Nous avons voulu déterminer si le cours temporel du cpm est modifié par le pH extracellulaire.

Protocole expérimental

Le potentiel de membrane est fixé à -100 mV. Afin de travailler avec des réponses d'amplitude similaire, nous avons maintenu le contenu quantique pratiquement constant en modifiant le rapport calcium - magnésium dans les solutions à différents pH, tout en maintenant constante l'osmolarité. Le nerf est stimulé à une fréquence constante de 0,2 Hz. Les enregistrements ont été filmés en contenu et la mesure des décours temporels faite sur un agrandisseur. Dans certaines expériences, nous avons utilisé un moyenneur automatique (Didac 800).

Résultats

Le décours temporel du cpm est modifié par le pH, comme le montre la fig 14. La durée de la période de décroissance non exponentielle augmente lorsqu'on passe de pH 9 à 7,2 puis à 5,2.

La période de décroissance exponentielle est également modifiée, elle s'allonge avec l'acidification du milieu. Ces résultats sont nettement visibles sur les courbes de décroissance du cpm en fonction du temps, établies en coordonnées semi-logarithmiques. (Fig. 13). Les valeurs numériques obtenues sur 10 préparations sont présentées dans le tableau 5.

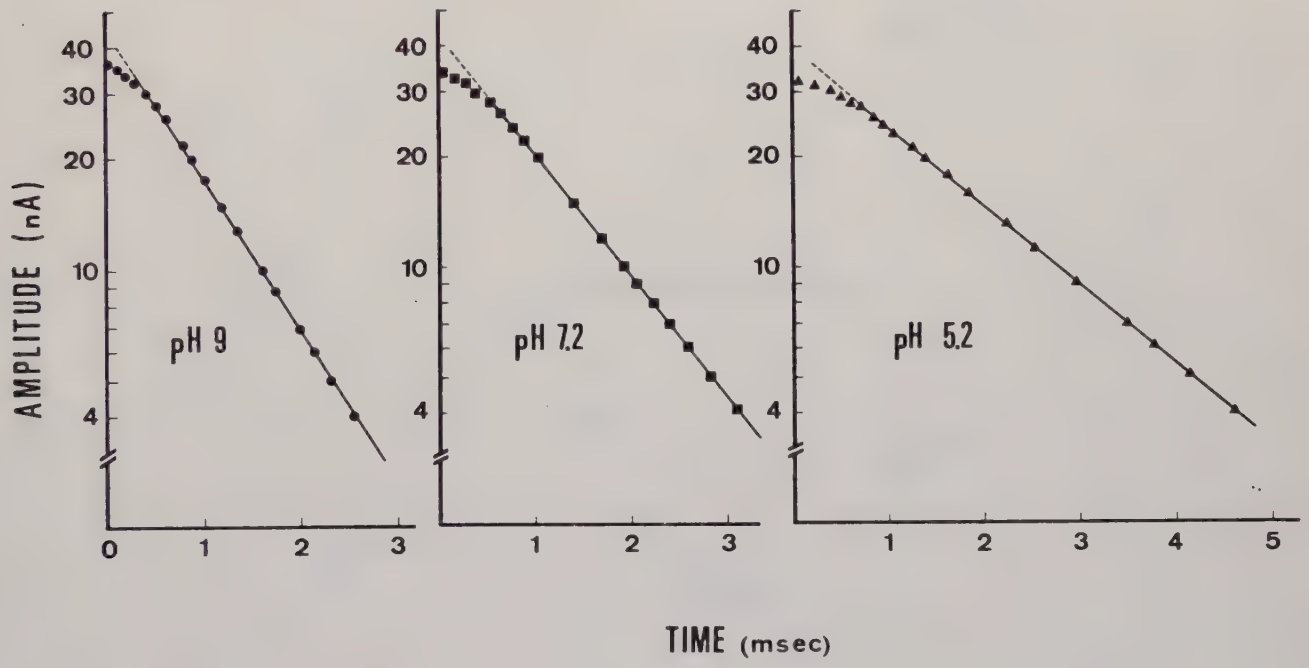


Fig. 13

Effets du pH sur la phase de décroissance du cpm, enregistrés sur la même fibre musculaire. En abcisses : temps, en ordonnées : amplitude du cpm, en échelle semi-logarithmiques, Potentiel imposé à -100 mV. Température 20°C.

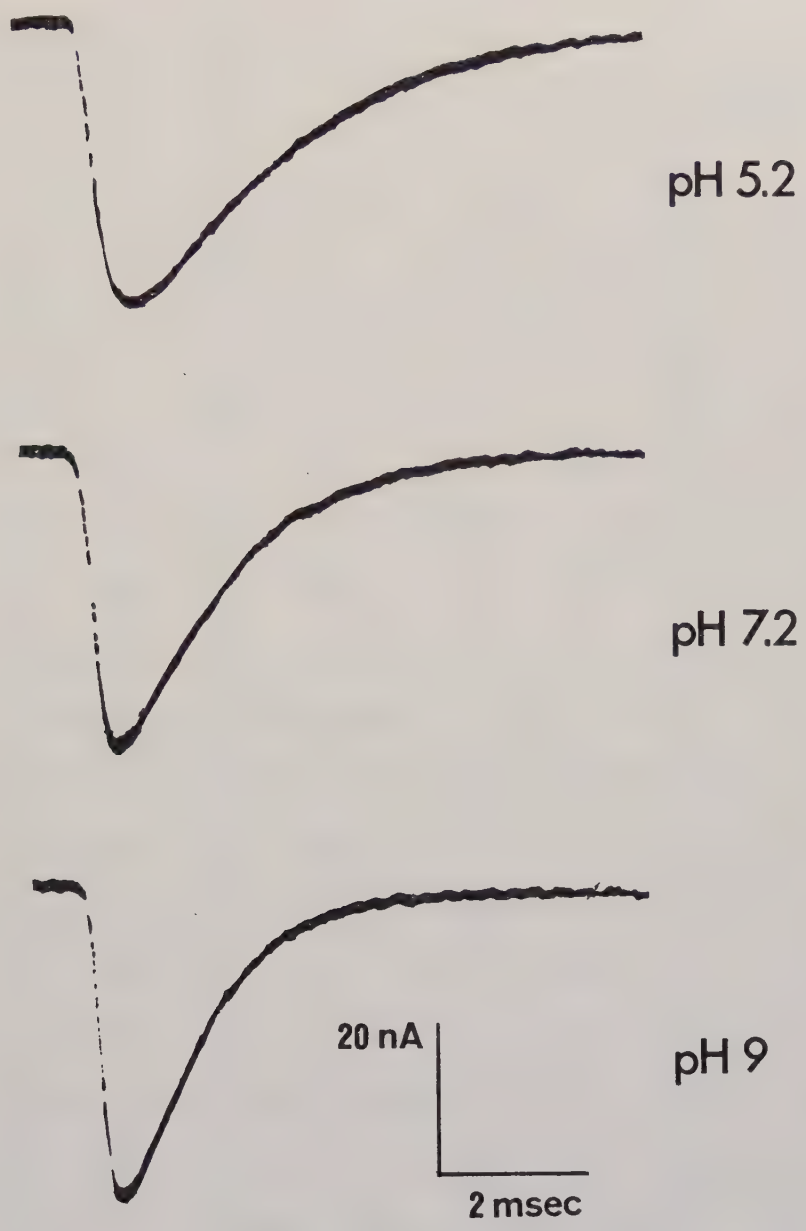


Fig.14 : Effets des changements du pH sur le décours temporel du cpm enregistrés sur la même cellule à 20 minutes d'intervalle aux pH indiqués. Température 20°C, potentiel imposé -100 mV

TABLEAU 5

EFFETS DU pH SUR LE TEMPS DE DEMI DECROISSANCE DU COURANT DE PLAQUE MOTRICE

(C P M) (msec)

Exp °	pH 5,2	pH 7,2	pH 9	Rapport pH 5.2/ pH 7.2	Rapport pH 9 / pH7.2
1	1,22 ± 0,16	0,86 ± 0,04	0,56 + 0,06	1,41	0,65
2	1,76 ± 0,14	1,17 ± 0,12	0,82 ± 0,06	1,50	0,70
3 °	1,44	1,04	0,81	1,38	0,77
4 °	1,32	0,91	0,72	1,45	0,79
5	2,04 ± 0,10	1,41 ± 0,08	1,05 ± 0,05	1,44	0,74
6 °	1,30	0,80	-	1,60	-
7 °	1,82	-	0,91	-	-
8	1,09 ± 0,04	0,82 ± 0,03	-	1,32	-
9		1,05 ± 0,07	0,83 ± 0,06	-	0,79
10	-	1,06 ± 0,04	0,73 ± 0,02	-	0,68
				n = 7 1,44 ± 0,09	n = 7 0,73 ± 0,05

± écart type de la moyenne

o résultat obtenu par moyennage automatique de 100 réponses

Chaque expérience réalisée sur la même fibre musculaire
potentiel imposé à -100 mV

Le temps de demi-décroissance est augmenté en moyenne de 44 % lorsqu'on passe du pH normal à pH acide, par contre, il est diminué en moyenne de 27 % à pH 9, ces effets sont réversibles par retour à pH 7,2. Le temps moyen de montée du cpm pour les 10 expériences présentées dans le tableau 5, n'est pas statistiquement différent aux trois pH étudiés. Ainsi, le temps de montée pour le pH 5,2 est égal à 0,82 $\pm$ 0,11 msec; pour le pH 7,2, 0,79 $\pm$ 0,07 msec et pour le pH 9, 0,74 $\pm$ 0,10 msec. Il faut signaler cependant que dans certaines expériences et lorsque le pH acide a été maintenu plus de 45 minutes, nous avons observé un allongement du sommet.

b) EFFETS DU pH SUR LE COURS TEMPOREL DES COURANTS MINIATURES INDUITS PAR LIBERATION SPONTANEE D'UN QUANTUM DE TRANSMETTEUR.

Afin d'écarter la possibilité que l'effet du pH sur le cours temporel du cpm dépende d'une dispersion plus ou moins grande des quanta libérés (Katz et Miledi, 1965), nous nous sommes proposés de vérifier si l'effet du pH se retrouve aussi sur le décours temporel des cpmm.

Pour cela, deux méthodes ont été envisagées : l'une consistant à enregistrer les cpmm sous voltage imposé (Takeuchi et Takeuchi, 1969; Gage et Armstrong, 1968; Gage et McBurney, 1972). Cependant, dans notre système expérimental, le temps de réponse et le rapport signal-bruit de fond n'étaient pas favorables pour l'utilisation systématique d'une telle méthode. L'autre, celle que nous avons choisie, est l'enregistrement focal.

Protocole expérimental

Nous avons enregistré focalement les cpmm au moyen

de micro-électrodes dont le diamètre à la pointe est de 3 à 5 µm, remplies de NaCl 0,5 M et ayant une résistance comprise entre 0,2 et 1 méghom. Par approximations successives, la micro-électrode extra-cellulaire peut être placée au voisinage immédiat de la terminaison nerveuse. Nous avons pris grand soin de ne pas exercer une forte pression mécanique sur la fibre musculaire, afin d'éviter autant que possible l'augmentation de fréquence des cpmm et leur décours temporel (Katz et Miledi, 1973a).

Dans quelques expériences, le potentiel de membrane a été suivi au moyen d'une microélectrode intracellulaire placée à quelques millimètres du point d'enregistrement focal.

Résultats

Comme le montrent les fig. 15 et 16, les changements de pH extracellulaire modifient aussi le décours temporel des courants miniature enregistrés focalement. La prolongation de la décroissance à pH acide, ainsi que le raccourcissement à pH alcalin, se sont produits après des temps de contact variant de quelques minutes à une demi-heure, après les changements des solutions baignant la préparation. Ces effets sont réversibles et peuvent être reproduits plusieurs fois sur la même cellule. L'exposition répétée à un pH donné soit alcalin , soit acide, augmente l'effet du pH sur le décours temporel.

Les cpmm enregistrés focalement au pH normal (7,2), montrent une décroissance exponentielle. Cependant, nous avons également observé parfois une partie non exponentielle qui est plus évidente à pH acide. Le temps de montée des cpmm n'est pas sensible aux changements de pH extracellulaires comme l'est la phase de décroissance.

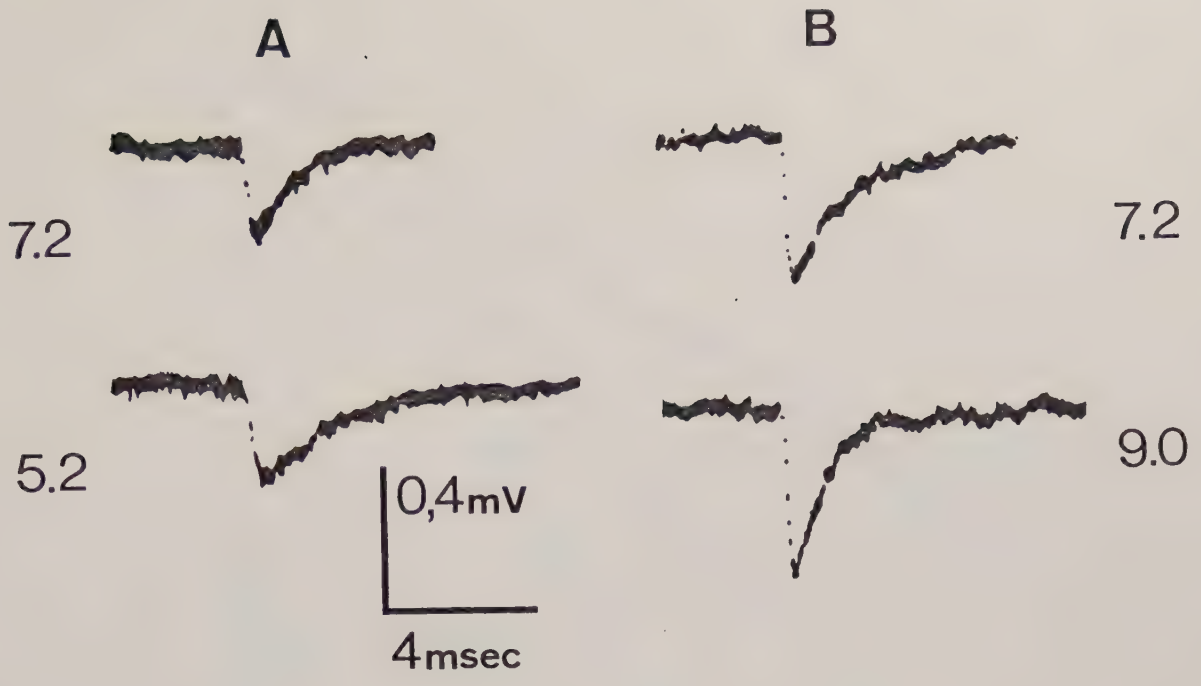


Fig. 15 : Courants miniatures enregistrés focalement après 20 minutes d'exposition aux pH indiqués. A et B sont deux expériences faites sur deux muscles différents, même calibration pour a et b, potentiel de membrane pour A : 87 ± 3 mV, potentiel de membrane pour B : 90 ± 1 .

Le tableau 6 montre les valeurs de la constante de temps de la décroissance (1/e) à différents pH extracellulaires.

TABLEAU 6

Cours temporel des courants de plaque motrice miniature.

Temps de montée	Constante de Temps de la décroissance (msec) (moyenne ± écart type)		
0,18 - 0,35 (msec)	pH = 5,2	pH = 7,2	pH = 9
	2,07 ± 0,21 n = 6	1,43 ± 0,24 n = 7	0,96 ± 0,08 n = 7

n = nombre de mesures

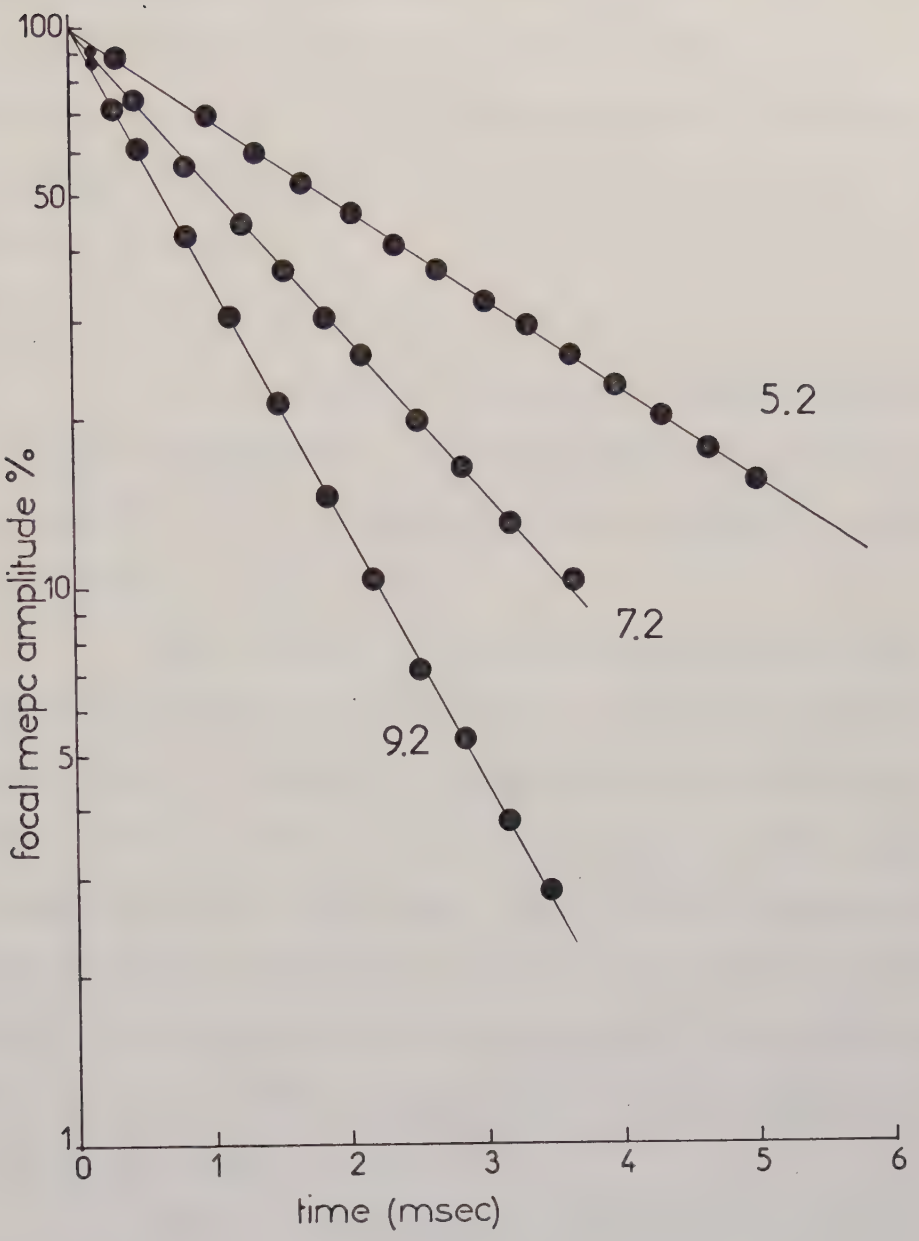


Fig. 16 : Effets du pH sur la décroissance des cpmm enregistrés focalement après 20 minutes d'équilibration aux pH indiqués sur la figure.

Au cours des expériences où le potentiel de membrane a été suivi par une microélectrode intracellulaire, nous avons constaté que le potentiel de repos est hyperpolarisé dans la plupart des cas, le pH est réduit de 7,2 à 5,2, l'hyperpolarisation varie entre 1 et 6 mV. Des résultats similaires ont été décrits (Meves et Völkner, 1958; Mainwood et Lee, 1968).

Discussion et conclusion a et b

Les résultats que nous venons d'exposer montrent que la décroissance exponentielle des cpm et des cpmm est modifiée de façon réversible par les changements de pH, s'allongeant à mesure que l'on réduit le pH de 9 à 5,2.

Cet effet peut être interprété comme étant dû à une modification, soit de la stabilité du complexe Acétylcholine-récepteur, soit de la vitesse de changement de conformation du récepteur après son interaction avec l'ACh (Kordas, 1969; Magleby et Stevens, 1972a, b), suivant que l'un ou l'autre détermine la vie moyenne des canaux synaptiques. Une autre interprétation possible peut être que les changements de pH modifient l'activité des cholinestérases, et que cet effet soit responsable des variations de décours que nous avons observées.

Une autre interprétation possible est que le pH modifie la diffusion de l'ACh à travers la fente synaptique, ce qui permettrait qu'il y ait des interactions répétées avec les récepteur de façon similaire à celle décrite par Katz et Miledi (1973a).

D'autre part, la partie non exponentielle du cpm est augmentée à mesure que le pH est abaissé de 9 à 5,2; cet effet

que nous avons observé au cours de toutes nos expériences, a été également décrit lorsqu'on abaisse la température, lors de traitements avec des inhibiteurs réversibles de cholinestérases et dans des milieux de survie dont le sodium a été réduit (Kordas, 1968a, 1972b). Les causes de cette augmentation ne sont pas claires pour l'instant, elles pourraient être le signe d'une prolongation de la persistance de l'ACh dans la gouttière synaptique, ou bien de l'inactivation d'une population de canaux ioniques à vie moyenne plus courte.

c). EFFETS DU pH SUR LE COURS TEMPOREL DU CPM ET DES CPMM EN PRESENCE DE PROSTIGMINE

Etant donné que l'activité des cholinestérases qui hydrolysent les molécules de ACh est dépendante du pH avec un optimum à pH 8,5 (Grauers, 1952; Bergman, Shimoni et Wurzel, 1956; Bergman, Rimon et Segal, 1958), nous avons voulu mesurer le cours temporel du cpm en présence d'un agent inhibiteur des cholinestérases dont l'action est indépendante du pH car, si les effets du pH sont dûs à une modification de l'activité de ces enzymes, leur inactivation ne devrait pas modifier le décours temporel du cpm ni des cpmm.

Protocole expérimental :

Nous avons utilisé la méthode du potentiel imposé pour l'enregistrement des cpm et la méthode de dérivation focale pour l'enregistrement des cpmm. Comme inhibiteur des cholinestérases nous avons choisi la prostigmine car l'activité de cette substance est indépendante du pH (Wilson et Bergman, 1950, 1952). Les solutions de prostigmine (cristallisée, Bromure Roche) ont été préparées immédiatement avant chaque expérience et ajoutées à la solution Ringer tamponnée aux différents pH. La concentration utilisée a été de 5×10^{-6}M, qui inhibe presque totalement l'activité cholinestérasique (Wilson, 1955; Levin et Jandorf, 1955; Straughan, 1960; Krnjevic et Mitchell, 1961; Krnjevic et Straughan, 1964; Potter, 1970). Le contenu quantique des cpm a été maintenu pratiquement constant en modifiant isotoniquement les proportions de Ca^{2+} et de Mg^{2+} aux différents pH; ceci était nécessaire, car il a été démontré que la phase décroissante du cpm varie avec l'amplitude de la réponse en présence de prostigmine (Kuba et Tomita, 1971). Les cpmm ont été enregistrés dans un milieu ionique normal.

Résultats expérimentaux :

a - Cours temporel du cpm.

Lors de l'addition de prostigmine (5×10^{-6} M) à la solution baignant la préparation et, après 30 minutes d'équilibration à pH normal, nous n'avons pas observé d'augmentation du temps de montée sur les 3/4 de la phase ascendante; cependant le sommet et la partie non exponentielle de la décroissance sont clairement prolongés.

Le temps de demi-décroissance du cpm est augmenté en myenne de 2,3 fois par rapport au témoin sans prostigmine et à pH 7,2. Lorsque on a modifié le pH du milieu de survie nous avons constaté une réduction du temps de demi-décroissance à pH 9, et une augmentation à pH 5,2 . Les résultats de trois expériences réalisées sont montrés dans la tableau 7. La figure 17 illustre un exemple de cpm en présence de prostigmine à deux pH différents et la décroissance du cpm en fonction du temps.

TABLEAU VII

Effets du pH sur le temps de demi décroissance (± écart type) du cpm obtenus sur la même fibre en présence de prostigmine 5×10^{-6} M.

Exp.	pH 5,2	pH 7,2	pH 9
1	•2,83 ± 0,28	2,32 ± 0,09	*2,0 ± 0,05
2	*3,29 ± 0,12	2,54 ± 0,06	*2,11 ± 0,04
3	•3,23 ± 0,39	2,33 ± 0,03	*2,02 ± 0,04

• $p < 0,01$
* $p < 0,001$
→ par rapport aux valeurs à pH 7,2

Potentiel imposé à - 100 mV; chaque expérience a été réalisée sur un muscle différent.

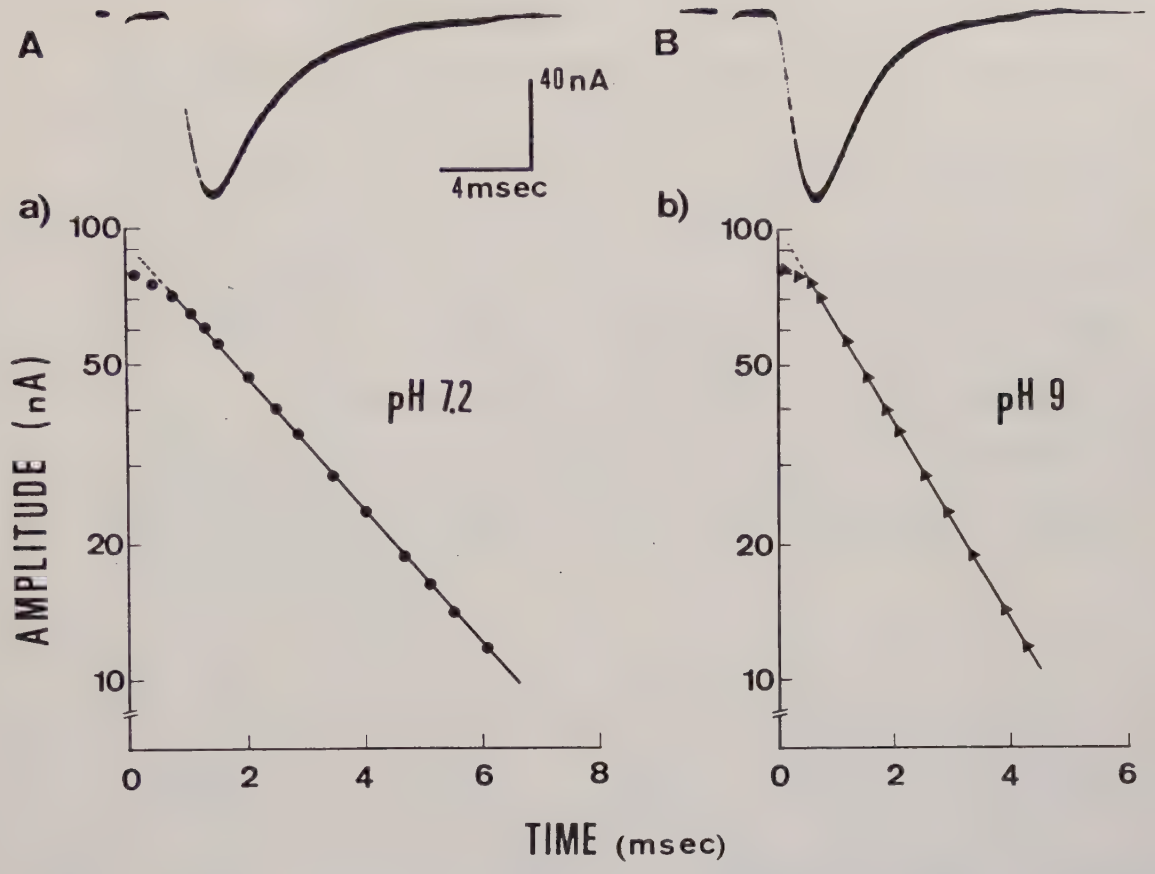


FIG. 17

Effets du pH sur le cours temporel du cpm enregistré en présence de prostigmine .

A/ cpm enregistré à pH normal 30 min après l'addition de prostigmine 5×10^{-6} M;

B/ cpm enregistré après 20 min d'exposition à pH 9 (même concentration de prostigmine que en A);

a) et b) décroissance des cpm en fonction du temps et en coordonnées semilogarithmiques. Potentiel de membrane imposé à -100 mV.

b - Cours temporel des courants miniature

Les cpmm subissent essentiellement les mêmes variations que le cpm en fonction du pH en présence de prostigmine.

Comme le montrent les fig. 18 et 19 le temps de demi-décroissance des cpmm est significativement augmenté lorsqu' on modifie de pH de 7,2 à 5, 2 et réduit lorsque l'on passe de pH 7,2 à 9,2 en présence de prostigmine. En outre, la variabilité de leur décours augmente, si bien qu'à pH 5,2 le coefficient de variation pour 4 expériences atteint 43% (inférieur à pH 7,2 et à pH 9,2).

La prostigmine ne modifie pas la phase ascendante des cpmm quelque soit le pH par contre, le sommet et la phase non exponentielle de la décroissance sont de plus longue durée, surtout en pH acide (Fig. 18).

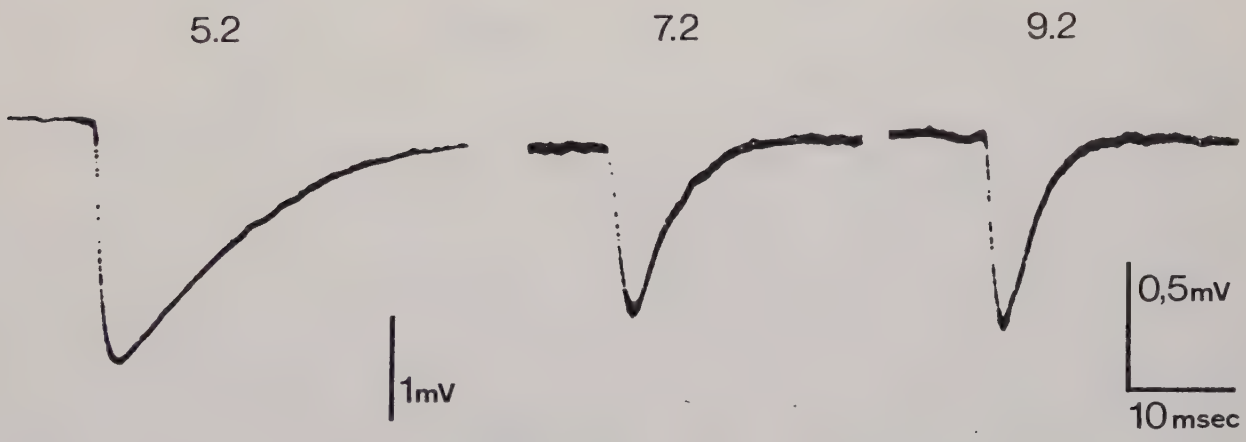


FIG. 18

Courants miniature typiques enregistrés focalement sur la même fibre musculaire aux pH indiqués en présence de prostigmine 5 x 10^{-6} M. Température 21°C.

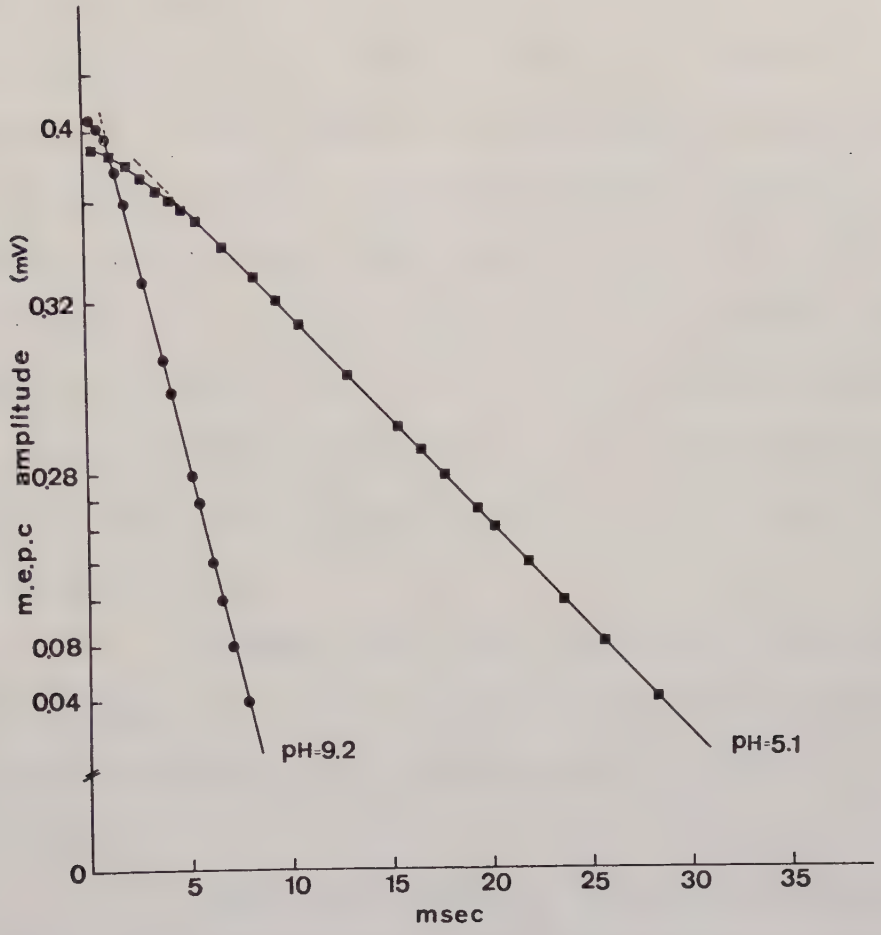


FIG. 19

Effets du pH sur la décroissance des cpmm enregistrés focalement sur la même jonction neuromusculaire et après 20 minutes d'équilibration aux pH indiqués sur la figure en présence de prostigmine (5×10^{-6} M).

Discussion et conclusion a et b

Lorsque les cholinestérases sont inhibées par la prostigmine, l'ACh n'est plus hydrolysée et par conséquent elle doit être éliminée de la gouttière synaptique par diffusion. Plusieurs travaux montrent que la simple diffusion de l'ACh serait trop rapide pour rendre compte de la prolongation de la décroissance exponentielle du cpm ou des cpmm en présence d'anticholinestérasiques (Eccles et Jaeger, 1958; Kuba et Tomita, 1971; Magleby et Stevens, 1972 a, b; Kuba, Albuquerque, Daly et Barnard, 1974; Magleby et Terrar, 1975). Par ailleurs, des études récentes d'analyse du bruit transmembranaire montrent que la durée d'ouverture des canaux synaptiques n'est pas modifiée par la prostigmine (Katz et Miledi, 1973 a).

Ces mêmes auteurs ont suggéré que l'activation répétée des récepteurs par l'ACh peut rendre compte de la prolongation de la décroissance des cpm et des cpmm après l'inhibition des cholinestérases.

Comme l'effet du pH sur la décroissance exponentielle des cpm et des cpmm persiste même après l'inhibition des cholinestérases on peut conclure que cet effet est indépendant de l'activité cholinestérasique.

d). EFFETS DE LA d-TUBOCURARINE SUR LE COURS TEMPOREL DU CPM A DIFFERENTS PH

La d-Tubocurarine, non seulement diminue l'amplitude du ppm ou du cpm, mais aussi raccourcit leur cours temporel en présence d'anticholinesterasiques (Eccles, Katz et Kuffler, 1942; Fatt et Katz, 1951; Beranek et Vyskočil, 1968; Takeuchi et Takeuchi, 1959; Magleby et Terrar, 1975). Cet effet a été aussi observé sur les courants miniatures (Katz et Miledi, 1973a). Ces derniers auteurs ont suggéré qu'un facteur important qui peut contribuer à la prolongation du décours temporel du cpm en présence d'inhibiteurs de cholinestérase, est une diffusion de l'ACh ralentie par des interactions répétitives avec les récepteurs synaptiques. Une façon de déterminer si l'effet du pH acide est due à cette diffusion retardée de l'ACh, est de réduire le nombre de récepteurs post-synaptiques disponibles au moyen d'un inhibiteur compétitif comme la d-Tubocurarine. Si l'effet du pH acide est dû à une interaction répétée avec les récepteurs, en présence de d-Tc, l'effet du pH acide devrait disparaître ou être réduit.

Protocole expérimental

Les préparations neuromusculaires ont été placées dans du Ringer normal contenant de la d-Tubocurarine (2×10^{-6} g/ml); dans quelques expériences, le cours temporel des cpm a été comparé en présence et en absence de d-Tubocurarine à pH 7,2, dans ces dernières expériences, la transmission étant bloquée par une proportion convenable de Ca^{2+} et mg^{2+}, afin d'obtenir des réponses d'amplitude similaire. Un moyenneur automatique Didac 800, a été utilisé.

Résultats

Après l'équilibration des préparations pendant 30 minutes en présence de d-Tubocurarine et Ringer normal, tamponné à pH 7,2, les cpm ont été enregistrés; ensuite, sur la même fibre musculaire, une solution à pH 5,2, contenant de la d-tubocurarine et 40% de calcium supplémentaire a été perfusée et les changements de décours ont été suivis pendant 20 à 30 minutes.

Dans ces conditions, les cpm ont une amplitude similaire, car les effets du pH acide sont compensés par l'addition du calcium. Le temps de montée en présence de d-Tubocurarine, aux deux pH étudiés ne diffèrent pas significativement et les valeurs sont comprises entre 0,62 et 0,82 msec. Par ailleurs, la partie non exponentielle de la décroissance des cpm est réduite aux deux pH par rapport aux expériences faites en absence de d-Tubocurarine.

L'abaissement du pH dans le milieu de survie détermine une augmentation de durée de la décroissance exponentielle du cpm d'environ 43 % par rapport à pH 7,2 (moyenne de trois expériences).

Les résultats d'une des expériences(moyennes de 30 mesures faites sur la même fibre musculaire), sont montrés dans la figure 20 .

D'autre part, nous avons noté que les valeurs absolues de la décroissance exponentielle en présence de d-Tubocurarine sont inférieures à celles que nous avions observées en absence de cet alcaloïde et en présence de Ringer (Mg^{2+} - Ca^{2+}) ; nous avons donc fait quelques expériences à pH normal, en présence et en absence de d-Tubocurarine sur la même fibre musculaire; dans ces conditions, nous avons observé comme le montre la figure 21 que la constante de temps de la décroissance (τ) est réduite lorsque le nombre de récepteurs libres est diminué.

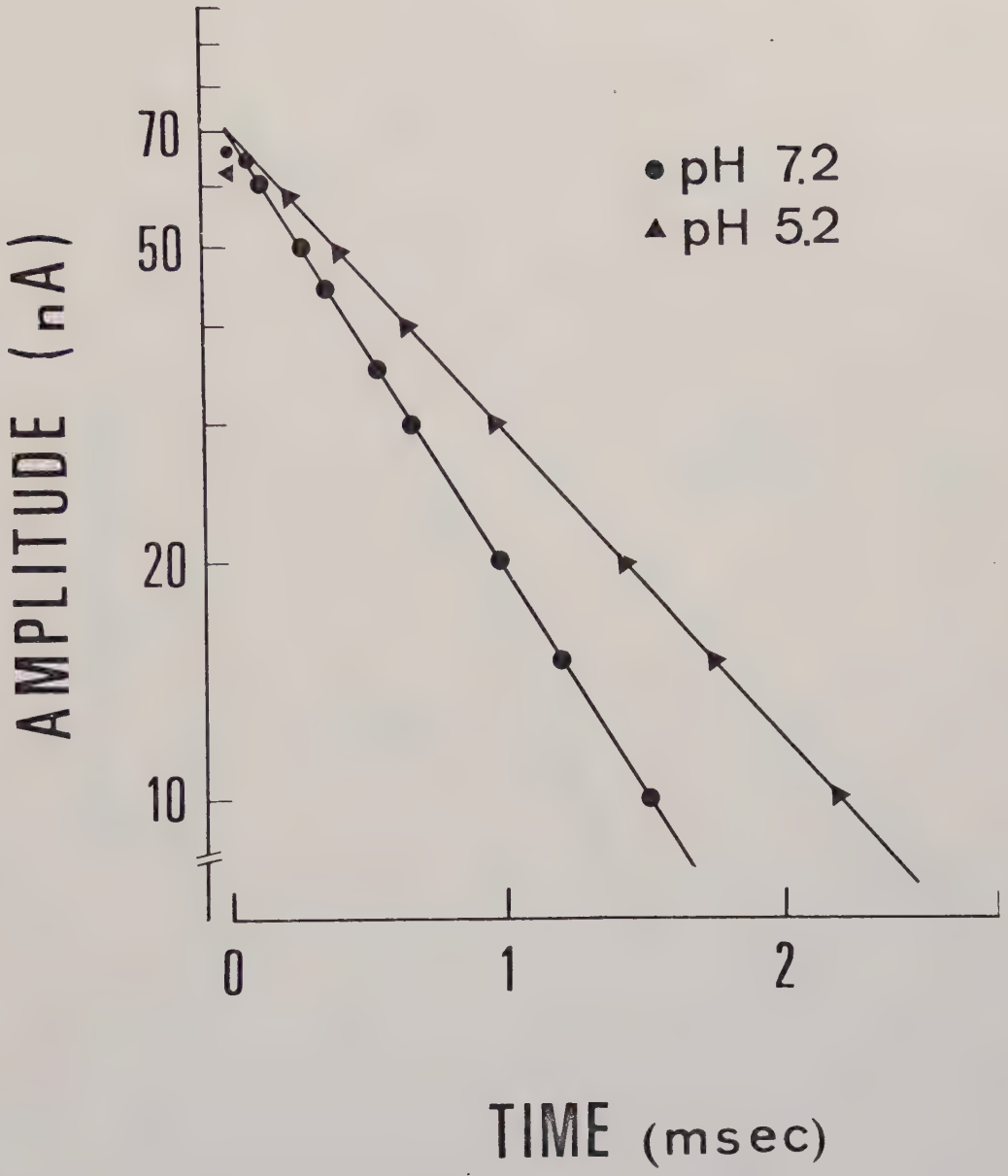


Fig 20 : Décours temporel de la décroissance du cpm à pH 7,2 (•) et après 30 minutes de perfusion à pH 5,2 (▲), en présence de d-Tubocurarine (2×10^{-6} g/ml). Potentiel de membrane imposé à -100mV

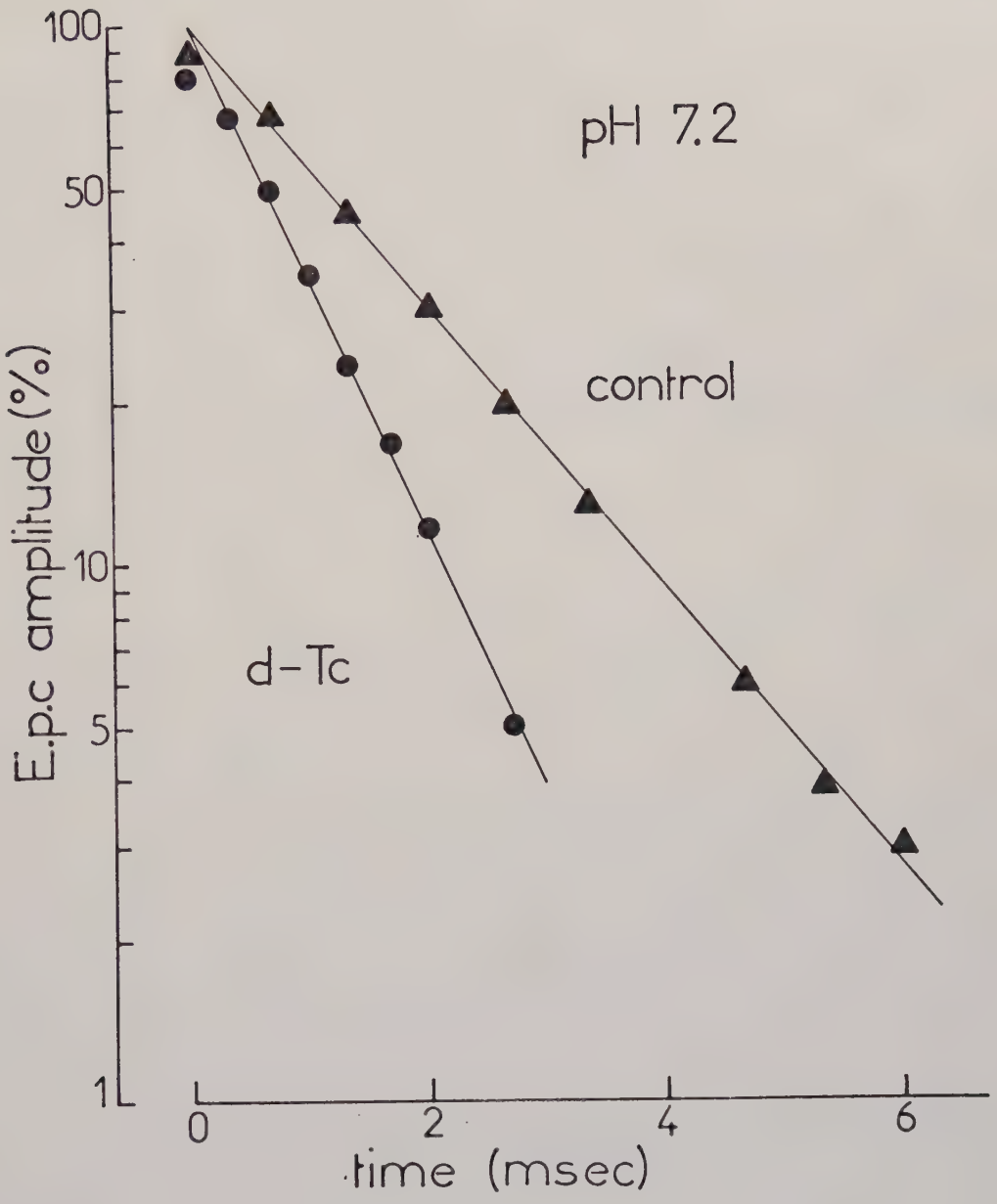


Fig 21 : Décours temporel du courant de plaque motrice en présence de d-Tubocurarine (2×10^{-6} g/ml) $\tau = 0,93$, et après 30 minutes de lavage de la préparation en présence de Ringer (Mg^{2+} - Ca^{2+})

$\tau = 1,6$ Potentiel de membrane imposé à -100mV.

Discussion et conclusion

Nos résultats montrent d'une part, que les effets du pH acide ne peuvent être expliqués comme étant dus à une diffusion retardée des molécules d'ACh, à mesure qu'elles diffusent dans la gouttière synaptique, car la diminution du nombre de récepteurs par la d-tubocurarine ne modifie pas l'effet du pH acide, sur la décroissance exponentielle du cpm. D'autre part, les résultats obtenus à pH normal avec ou sans d-tubocurarine, suggèrent que, même en l'absence d'anticholinestérasiques, il existe un retard dans la diffusion d'ACh causé par des liaisons répétées avec les récepteurs.

e). EFFETS DU pH SUR LE COURS TEMPOREL DES COURANTS SYNAPTIQUES EVOQUES PAR L'APPLICATION IONOPHORETIQUE D'ACh

Les résultats exposés auparavant ont montré que la taille d'un quantum d'ACh est constante pour les trois pH étudiés. Cependant on peut se demander si des variations du quantum libéré existent mais seraient masquées par des variations en sens opposé de la sensibilité du récepteur à l'ACh en fonction du pH.

Afin de résoudre cette question, des doses constantes d'ACh ont été appliquées ionophorétiquement sur la membrane post-synaptique aux différentes valeurs du pH externe; cette méthode permet d'autre partd'étudier le cours temporel du courant synaptique indépendamment de la libération présynaptique.

Protocole expérimental :

Nous avons utilisé la technique du potentiel imposé, le courant synaptique au lieu d 'être évoqué par stimulation du nerf a été obtenu par l'application ionophorétique d'ACh. Pour cela, nous avons utilisé des micro-pipett es contenant de l'ACh (2 M) de résistance convenable (60 à 120 mégohms).

Les pipettes ont été blindées avec une feuille d'aluminium sur toute la partie qui n'est pas en contact avec la solution baignant la préparation;le blindage est ensuite mis à la terre. Des chocs carrés (10^{-8} à 10^{-7} nA) et de 5 à 20 msec de durée ont été appliqués à la micro-pipette; la diffusion spontanée a été évitée en appliquant un courant de freinage d'environ 4 nA comme cela a été décrit par Krnjevic et Miledi, 1958. Le repérage des récepteurs jonctionnels se fait par approches successives de la zone de la plaque motrice; la pipette est laissée en place à

un point de sensibilité maximum à l'ACh où les réponses ont un temps de montée de l'ordre de 10 msec. L'intensité et la durée du courant d'ionophorèse sont maintenues constantes pendant toute l'expérience. Afin d'éviter le déclenchement des potentiels d'action musculaire, de la tétrodotoxine (5×10^{-8} g/ml) a été ajoutée à la solution Ringer normal tamponnée aux différents pH. Il a été démontré que cette biotoxine ne modifie pas les courants synaptiques (Katz et Miledi, 1967 a).

Résultats

Les résultats obtenus montrent que l'amplitude du courant synaptique n'est pas significativement modifiée lorsqu'une dose constante d'ACh est appliquée toutes les 30 secondes et lorsqu'on passe de pH 9 à pH 7,2 (fig. 22 A); toutefois, une légère augmentation de l'amplitude du courant synaptique a été observée au début de la perfusion à pH 5,2 suivie d'une décroissance qui après s'est stabilisée. Le temps de montée du courant synaptique ne varie pas en fonction du pH. Par contre, le décours temporel des réponses synaptiques évoquées par l'ACh est modifié par le pH; ainsi le pH alcalin a déterminé une diminution du temps de demi-décroissance (fig. 22 B) et le pH acide une augmentation. Les valeurs relatives sont similaires à celles que nous avons obtenues sur le cpm. Ces effets sont réversibles même après 4 heures d'exposition à un même pH. (pH 9).

Dans le but de se débarrasser d'un éventuel effet du pH sur la cholinestérase, ces expériences ont été effectuées également en présence de prostigmine.

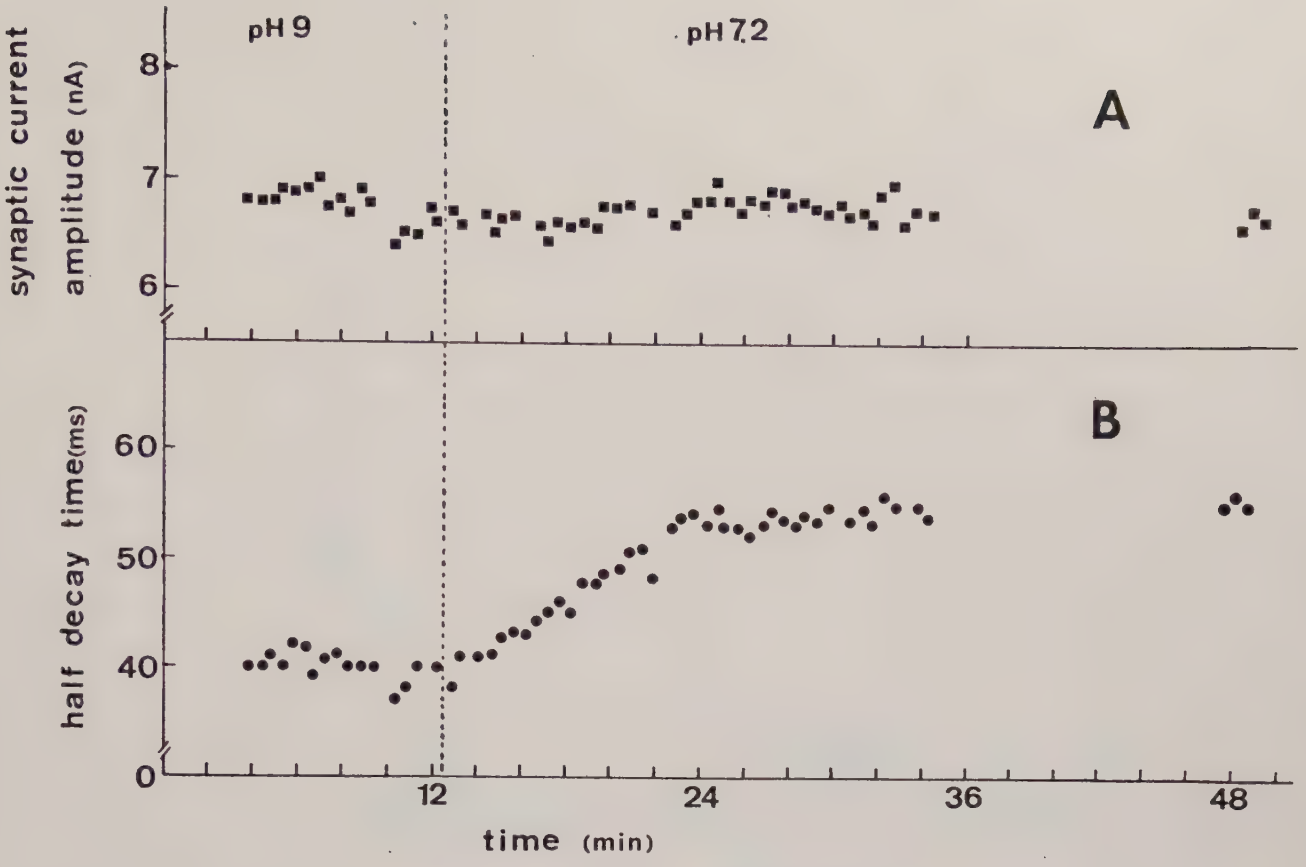


FIG. 22

Effets du pH 9 et du pH 7,2 sur l'amplitude (A) et le temps de demi décroissance (B) du courant synaptique évoqué par l'application ionophorétique d'ACh. En abscisses : temps en minutes. Potentiel imposé à - 100 mV. Température 22°.

L'amplitude du courant synaptique évoqué par une dose constante d'ACh est nettement augmentée lorsqu'on ajoute de la prostigmine (5×10^{-6} M) à la solution qui baigne la préparation (pH normal 7,2). Un exemple de cet effet est illustré dans la figure n° 23 , l'augmentation maximale étant obtenue en environ 10 à 15 mn de perfusion.

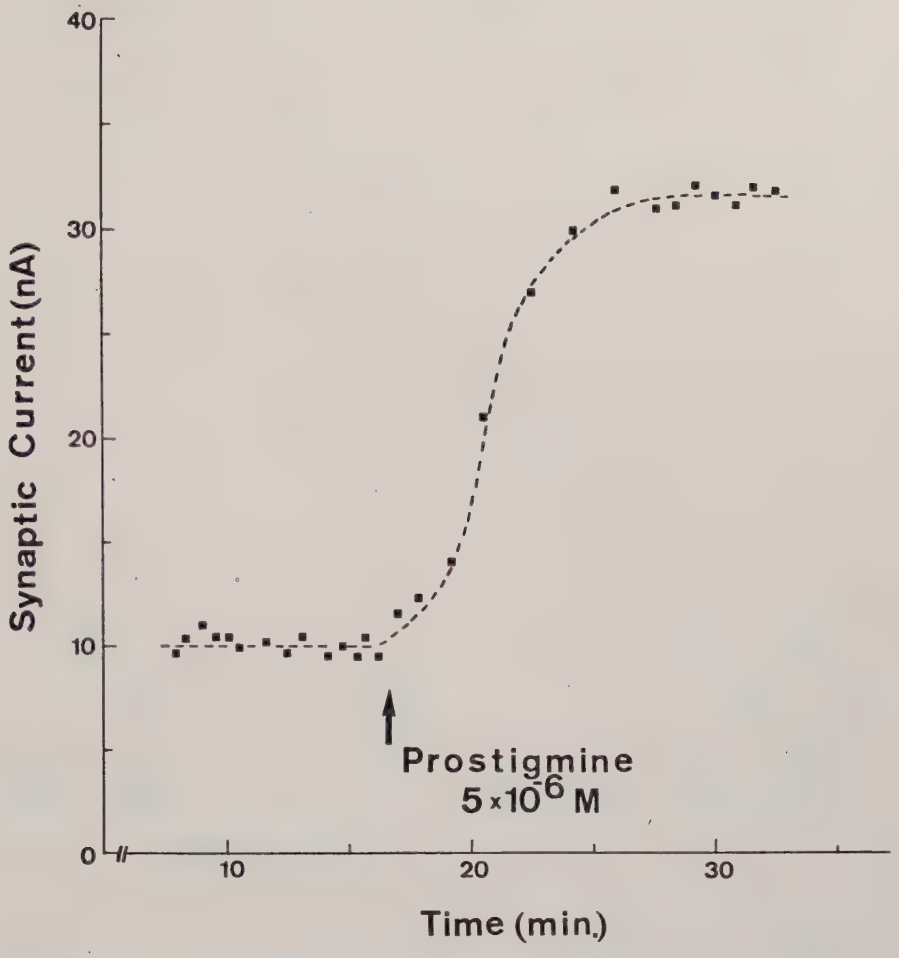


FIG. 23

Effets de la prostigmine sur l'amplitude du courant synaptique évoqué par une dose constante d'ACh. En abscisse : temps. La flèche indique le moment où la prostigmine a été ajoutée à la solution baignant la préparation. En ordonnées : amplitude du courant synaptique. Potentiel imposé : - 100 mV.

D'autre part, la phase de décroissance du courant synaptique en présence de prostigmine est augmentée en moyenne de 6 à 8 fois par rapport au témoin. Nous avons étudié les effets du pH une fois que les préparations s'étaient équilibrées au moins pendant 30 minutes en présence de prostigmine. Les résultats montrent que dans ces conditions la sensibilité au pH de la décroissance du courant synaptique n'est pas modifiée, le pH acide entraîne toujours une augmentation de la constante de temps de la décroissance par

rapport au pH normal et le pH 9 une diminution. Les résultats d'une de ces expériences sont montrés sur la figure 24.

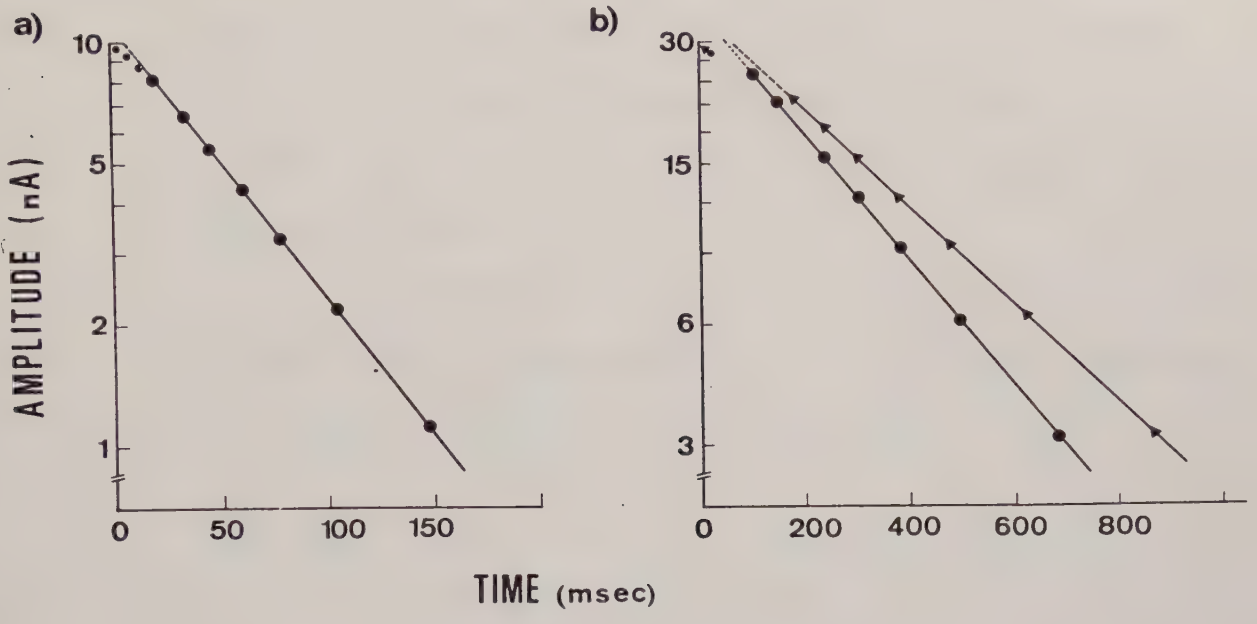


FIG. 24

Décours temporel de la décroissance du courant synaptique évoqué par l'application ionophorétique d'ACh. a) En Ringer normal pH 7,2 b) après addition de prostigmine 5 x 10^{-6} M. Les ronds représentent le décours temporel à pH 7,2 et les triangles à pH 5,2. Remarquer le changement d'échelle entre a) et b)

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats que nous venons de présenter montrent d'une part que l'amplitude du courant synaptique évoquée par une dose constante d'ACh n'est pas significativement modifiée par le pH externe entre 9 et 7,2. Ces résultats suggèrent que l'activité intrinsèque de l'ACh et l'affinité du récepteur pour l'ACh ne sont pas modifiées par le pH entre 7 et 9 ; par contre à pH acide

l'augmentation initiale de l'amplitude du cpm n'a pas été étudiée systématiquement, et sur la base des résultats obtenus on ne peut pas conclure. Ces résultats sont en partie d'accord avec ceux décrits par Martinez-Carrion et Raftery (1973) sur le récepteur isolé de l'organe électrique de la torpille qui ont montré que l'affinité d'un ligand fluorescent pour le récepteur à l'ACh est constante pour des valeurs de pH supérieur à 7, mais par contre augmentée en desous de pH 7.

Les résultats obtenus sur le décours du courant synaptique confirment ceux obtenus ave le cpm. Par ailleurs, la présence de prostigmine ne modifie pas les effets du pH.

f). EFFETS DE LA TEMPERATURE SUR LE COURS TEMPOREL DU CPM A DIFFERENTS pH

Le décours temporel du cpm est très sensible aux changements de température (Takeuchi et Takeuchi, 1959; Kordas, 1972b Magleby et Stevens, 1972b, Kuba, Albuquerque, Daly et Barnard, 1974).

Nous avons voulu examiner si les changements de température modifient les variations du décours temporel que nous avons observé du cpm, à différents pH.

Protocole expérimental

Les enregistrements du courant synaptique évoqué par la stimulation du nerf ont été réalisés en potentiel imposé. La température de la solution baignant la préparation a été modifiée par la méthode décrite auparavant (chapitre 1). Le contenu quantique du cpm aux différents pH a été maintenu pratiquement constant en modifiant isotoniquement les proportions de calcium/magnésium dans la solution de Ringer.

RESULTATS

L'amplitude des cpm diminue en moyenne de 50 % lorsqu'on abaisse de 20 à 10° la température pour les trois pH étudiés, cet effet étant dû à une diminution du contenu quantique.

Par contre, l'amplitude des cpmm n'est pas modifiée significativement entre 20 et 10° ($p > 0,05$).

La latence des réponses est significativement augmentée, vraisemblablement à cause d'une diminution de la vitesse de conduction et d'une augmentation du délai synaptique à basse température (Lucas, 1908; Katz et Miledi, 1965). Cet effet est significativement augmenté à pH 5,2 par rapport à pH 9 et à pH 7,2. Par ailleurs, le courant nécessaire à imposer un potentiel de membrane donné diminue à basse

température à cause de l'augmentation de résistance de la membrane (Del Castillo et Machne, 1953, Sperelakis, 1969).

Le temps de montée du cpm est augmenté lorsqu'on baisse la température de 20 à 10°C, les valeurs de Q 10 étant de 1,8 en moyenne, pour les trois pH étudiés. La partie non exponentielle de la décroissance augmente lorsqu'on baisse la température, à 10°C, elle peut atteindre une durée de 5 msec à pH 5,2 et étant moins importante à pH 7,2 et à pH 9.

La constante de temps de la décroissance exponentielle (τ), est beaucoup plus sensible aux changements de température que la phase ascendante aux trois pH étudiés. Le tableau 8 montre les valeurs numériques de 3 expériences. Le graphique de la fig. 25 montre les variations τ à différents pH en fonction de la température sur une même préparation.

Comme le montre cette figure, le Q 10 de τ n'est pas modifié par le pH extracellulaire. (cf. tableau 8).

En dépit du fait que le Q 10 donne une indication sur l'influence de la température sur les processus biologiques (Snyder, 1911), c'est une description empirique. Une méthode plus précise pour exprimer quantitativement les effets de la température sur les systèmes biologiques est d'utiliser l'équation d' Arrhenius. (Fuhrman et Fuhrman 1961) qui donne les variations de la constante de vitesse d'une réaction avec la température ;

$$K = Ae^{-E/RT}$$

dans laquelle K est la constante de vitesse de la réaction,
A est la constante, de vitesse théorique maximum,
E est l'énergie d'activation de la réaction,

R est la constante des gaz parfaits,

T , la température absolue.

Comme $1/\tau$ est la constante de vitesse de la décroissance exponentielle du cpm, on a :

$$1/\tau = Ae^{-E/RT}$$

donc $$\ln\tau = -\ln A + E/RT$$

Si on porte sur un graphique $-\ln\tau$ en fonction de $1/T$, on obtient une droite de pente $-E/R$, qui permet de calculer E; c'est ce que montre la figure 26 . Une relation linéaire existe entre $\ln\tau$ et $1/T$ pour les trois pH étudiés, les valeurs de E, calculées sont égales à 13-14 Kcal

TABLEAU 8

Effets de la température sur la constante de temps de la décroissance à différent pH (msec).

Exp.	Temp. °C	pH 5,2	pH 7,2	pH 9,0
1 ★	20° 10°	3,48 9,29	1,41 3,64	1,17 3,05
2 ○	20° 10°	1,29 3,76	1,05 2,82	0,61 1,48
3 ★	20° 10°	2,70 6,78	1,31 3,52	1,11 2,70
	Q 10	2,6	2,6	2,5

★ potentiel imposé a - 100 mV
○ potentiel imposé a - 80 mV

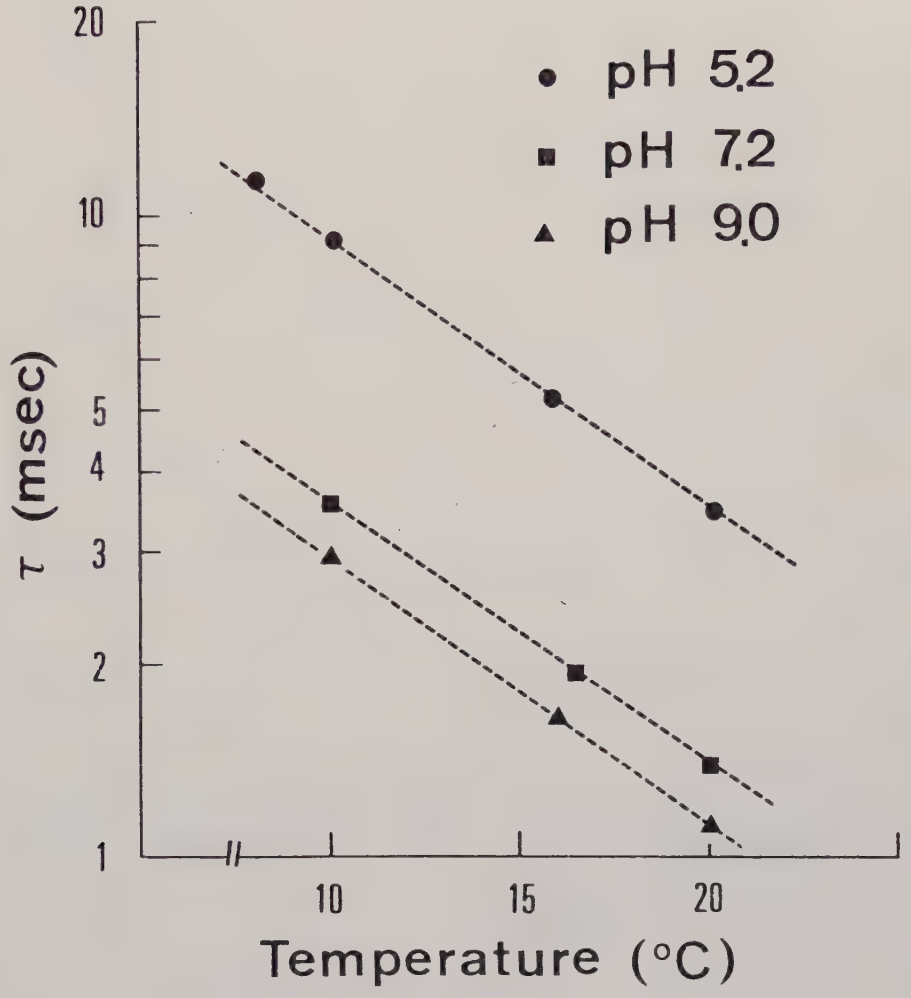


Fig.25. : Effets de la température sur la constante de temps de la décroissance (τ msec) du cpm, enregistré sur la même fibre musculaire, à différents pH. Potentiel imposé -100 mV. Le Q 10 pour les 3 pH, étant de 2,60.

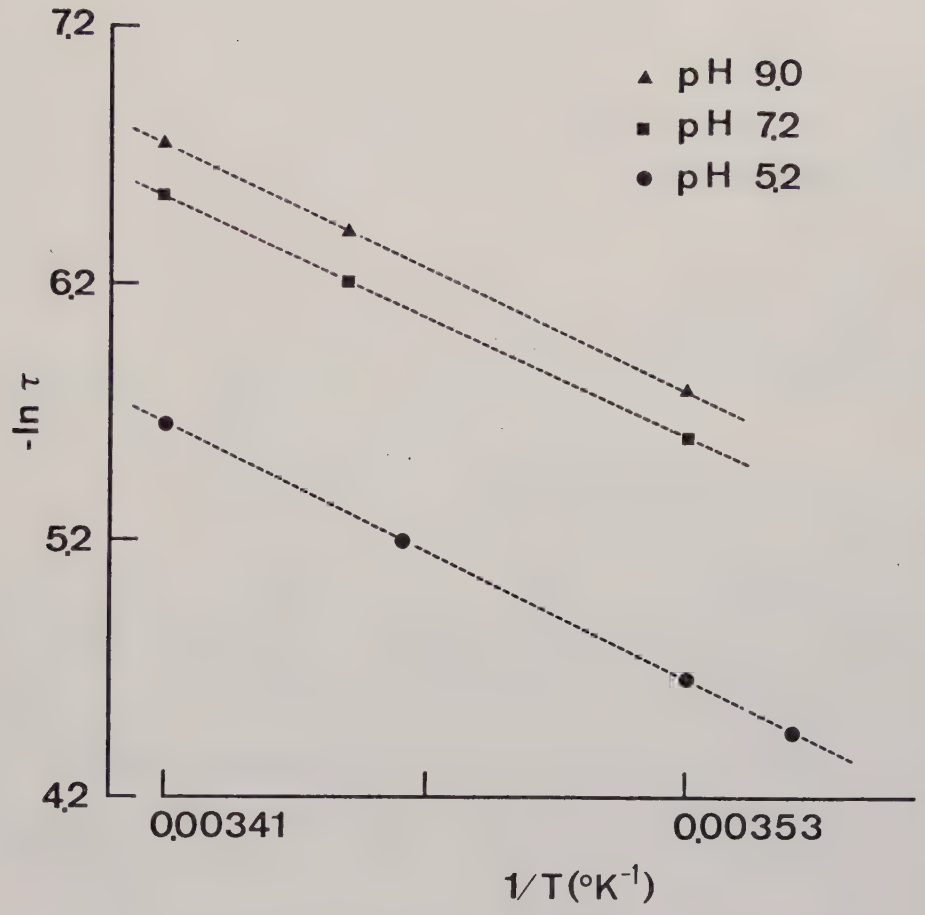


Fig.26 : Représentation d'Arrhenius qui montre les effets de la température sur la constante de temps (τ) de la décroissance du cpm à différents pH. L'énergie d'activation E, étant de 13,8 13,8 et 14,4 Kcal pour le pH 9,0, 7,2 et 5,2 respectivement.

Discussion

Nos résultats montrent d'une part, que la phase ascendante du cpm aux 3 pH étudiés est moins sensible à la température que la phase de décroissance. Ceci laisse supposer que la phase ascendante et de décroissance exponentielle sont gouvernées par différents mécanismes et que le pH exerce seulement un rôle sur la dernière.

Le fait que la relation d'Arrhenius donne une droite simple est en faveur d'une réaction de premier ordre, dont l'énergie d'activation n'est pas affectée par le pH.

Comme la décroissance exponentielle a un Q_{10} compris entre 2 et 3, les processus qui contrôlent la décroissance du cpm ne peuvent être dus à la simple diffusion d'ACh. Il s'agirait plutôt d'une action au niveau des récepteurs, car la durée et l'amplitude des courants élémentaires sont affectées par la température (Katz et Miledi, 1972, 1973b; Anderson et Stevens, 1973).

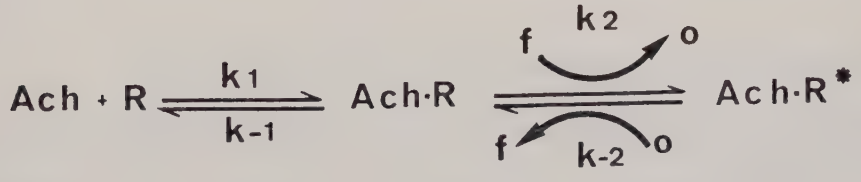
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES.

Les variations de pH dans le milieu de survie modifient la libération spontanée et évoquée de transmetteur. Pour expliquer les effets au niveau de la libération spontanée de transmetteur, nous avons proposé une hypothèse faisant participer des charges à la surface des vésicules et de la face interne et externe de l'axolemme ,capables d'être modifiées par l'activité des ions H^+. D'autres interprétations sont possibles comme par exemple une action des H^+ au niveau de la rétention intra-mitochondriale de calcium.

En ce qui concerne la libération évoquée de transmetteur, le pH semble agir d'une part au niveau du potentiel d'action pré-synaptique et d'autre part au niveau des sites de libération. Le fait que le calcium puisse contrebalancer les effets du pH acide suggère une compétition entre ce cation et les ions H^+ pour certains sites, qui interviennent dans la libération évoquée de transmetteur. Les résultats obtenus sur le cours temporel du courant synaptique,montrent d'une part que la phase ascendante du cpm, et des cpmm n'est pas exponentielle et qu'elle n'est pas modifiée par les changements de pH extracellulaire et, d'autre part, qu'elle présente un Q 10 voisin de 1,8 qui caractérise vraisemblablement une libération asynchronique de transmetteur. La décroissance exponentielle du cpm et des cpmm est modifiée par le pH. Cet effet est indépendant de l'inhibition de cholinestérases, de la libération pré-synaptique et ne semble pas être du non plus à l'activation répétée des récepteurs car l'effet du pH persiste en présence de d-Tubocurarine.

Tout cela suggère que les variations de pH modifient la cinétique de l'interaction ACh-Récepteur, qui définit l'étape limitante de la durée du changement de conductance. La réaction entre l'ACh et le Récepteur peut être représentée par une réaction réversible comprenant deux étapes.

La première est déterminée par la formation d'un complexe intermédiaire inactif (ACh-R), et la deuxième comporte un changement de conformation du complexe ACh-Récepteur. Cette forme "active" ($ACh\text{-}R^*$) s'accompagne de l'ouverture des voies ioniques. Ceci peut être représenté de la façon suivante



Le pH agit donc sur l'étape limitante de la réaction. Celle-ci peut être, soit la vitesse d'association ACh-Récepteur ($k_1 << k_2$, $k_1 / k_{-1} << k_2 / k_{-2}$

Soit le changement de conformation qui suit cette interaction

($k_1 >> k_2$, $k_1 / k_{-1} >> k_2 / k_{-2}$)

L'augmentation de concentration des ions H^+ entrainerait

une diminution de k_1 dans la 1ère hypothèse, de k_2 dans la deuxième. Le pH, par contre, n'agit pas sur l'énergie d'activation de l'étape limitante.

D'autre part, la partie non exponentielle de la décroissance des cpm (présente également dans certains courants miniature) augmente à mesure que l'on abaisse le pH, la température, le sodium externe, ou lorsqu'on inhibe les cholinestérases. Ceci peut s'expliquer par la persistance de l'ACh au niveau de la fente synaptique (car cette phase est raccourcie lorsque le nombre de récepteurs disponibles est réduit par la d-Tubocurarine), ou d'autre part, être le signe d'une population de canaux ioniques ayant une vie moyenne plus courte.

La mise en oeuvre d'un programme de recherche sur la durée des courants élémentaires est donc nécessaire, afin de pouvoir déterminer si les effets du pH sont dûs à une modification de la durée de courants élémentaires de façon similaire à celle observée pour certains alcools (Gage et MacBurney, Schneider, 1975; Gage et MacBurney, 1975).

En résumé, les variations de pH dans le milieu de survie modifient toutes les étapes de la transmission neuromusculaire : l'initiation du potentiel d'action pré-synaptique, sa conduction au long de la terminaison, la libération spontanée et évoquée de transmetteur, et la réaction avec la membrane post-synaptique, de plus la génération du potentiel d'action et finalement la contraction musculaire.

RESUME

Les effets pré-synaptiques et post-synaptiques des changements de pH dans le milieu de survie ont été étudiés à la jonction neuromusculaire de Grenouille.

Les résultats montrent que la libération spontanée d'Acétylcholine à la jonction neuromusculaire est nettement accrue lorsqu'on abaisse le pH extracellulaire de 7,2 à 5,2, Ces effets sont indépendants de la présence de calcium extracellulaire et ne semblent pas être dus à la dépolarisation des terminaisons nerveuses ; d'autre part, la fréquence des miniatures à pH 5,2 n'est pas modifiée par les changements de température.

Une hypothèse qui fait participer des charges de surface, pouvant être modifiées par le pH peut rendre compte de ces résultats.

Le pH modifie aussi la libération évoquée de transmetteur, ce qui se manifeste par une augmentation du contenu quantique du courant de la plaque motrice à mesure que l'on augmente le pH de 5,2 à 9, effets qui ne sont pas dûs à une variation de la taille du quantum d'Acétylcholine.

Les effets de l'augmentation de concentration externe de H^+, peuvent être antagonisés par une augmentation de concentration de calcium ce qui suggère la possibilité que les H^+ entrent en compétition avec le calcium, pour certains sites de la membrane pré-synaptique, responsables de la libération évoquée de transmetteur.

Les effets post-synaptiques du pH ont été étudiés en ce qui concerne le cours temporel du courant de plaque motrice et des courants miniatures. Les résultats obtenus montrent que les

variations de pH entre 5,2 et 9, ne modifient pas le temps de montée du courant synaptique mais par contre, modifient significativement la décroissance exponentielle du courant de plaque motrice et des courants miniatures; elle diminue lorsqu'on augmente le pH de 5,2 à 9.

Ces effets ont été observés également en présence d'un anticholinestérasique dont l'action n'est pas modifiée par le pH et en présence de d-Tubocurarine qui diminue le nombre de récepteurs disponibles à l'acétylcholine.

Par ailleurs, la température ne modifie pas les effets du pH sur la décroissance du courant de plaque motrice.

Un Q 10, d'environ 2,6, une relation d'Arrhenius donnant une droite simple aux trois pH étudiés (5,2 - 7,2 - 9) suggèrent pour les processus contrôlant la décroissance du courant synaptique, une réaction de premier ordre dont le pH ne modifie pas l'énergie d'activation.

Les résultats obtenus sur la décroissance du courant synaptique ne peuvent être interprétés comme étant dûs à une modification de la diffusion de l'Acétylcholine à travers la fente synaptique mais à une modification de la vie moyenne des canaux synaptiques , qu'elle soit limitée par la stabilité du complexe Acetylcholine-Récepteur, ou par la vitesse de changement de conformation du récepteur lors de son interaction avec l'ACh.

B I B L I O G R A P H I E

ADRIAN, R.H. (1956) - The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle.
J. Physiol., (Lond.), 133, 631-658

ALBUQUERQUE, E.X., KUBA, K., DALY, J. (1974) - Effect of histrionicotoxin on the ionic conductance modulator of the cholinergic receptor : A quantitative analysis of the end-plate current.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 189, 513-524.

ANDERSON, C.R., STEVENS, C.F. (1973) - Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end plate current fluctuations at frog neuromuscular junction.
J. Physiol., (Lond.), 235, 655-691.

ARGIBAY, J., CAPUTO, C. (1971) - Effect of calcium deprivation on frog skeletal muscles at different pH values.
J. Membrane Biol., 4, 68-73.

AUERBACH, A., BETZ, W. (1971) - Does curare affect transmitter release ?
J. Physiol.,(Lond.), 213, 691-705.

BAKER, P.F., HODGKIN, A.L., RIDGWAY, E.B. (1971) - Depolarization and calcium entry in squid giant axons
J. Physiol. (Lond), 218, 709-756.

BAKER, P.F. (1972) - Transport and metabolism of calcium ions in nerve. Prog. Biophys. Molec. Biol., 24, 177-223.

BARNARD, E.A., WIECKOWSKI, J., CHIU, T.H. (1971) - Cholinergic receptor molecules and cholinesterase molecules at mouse skeletal muscle junctio Nature, 234, 207-209.

BARNARD, E.A., CHIU, T.H., JEDRZEJCYZK, J., PORTER, C.W., WIECKOWSKI, J. (1973) - Acetylcholine receptor and cholinesterase molecules of vertebrate skeletal muscles and their nerve junctions. dans : "Drug Receptors", édit. H.P. Rang, MacMillan, 225-240.

BASS, L., MOORE, W.J.(1966) - Electrokinetic mechanism of miniature post-synaptic potentials . Proc. Nat. Acad. Sci. USA. , 55, 1214-1217.

BEN-HAIM, D., DREYER, F., PEPER, K. (1975) - Acetylcholine receptor : modification of synaptic gating mechanism after treatment with disulfide bond reducing agent. Pflügers Arch., 355, 19-26.

BENOIT, P.R., MAMBRINI, J. (1970) - Modification of transmitter release by ions which prolong the presynaptic action potential. J. Physiol.,(Lond.), 210, 681-695.

BENOIT, P.H., AUDIBERT-BENOIT, M.L., PEYROT, M. (1973) - Importance des effets pré-synaptiques dans le blocage de la jonction neuro-musculaire de Grenouille par substitution du lithium au sodium dans le milieu de survie.
Arch. Ital. Biol., 111, 323-335.

BENOIT, P., HEMLEY, S. (1973) - Effets du pH sur la libération du transmetteur à la jonction neuromusculaire.
J. Physiol. (Paris), 67, 332 A.

BERANEK, K., VYSKOČIL, F. (1968) - The effect of atropine on the frog sartorius neuromuscular junction .
J. Physiol. (Lond.), 195, 493-503.

BERGMAN, F., SEGAL, R. (1954) - The relationship of quaternary ammonium salts to the anionic sites of true and pseudocholinesterase.
Biochem. J., 58, 692-698.

BERGMAN, F., SHIMONI, A., WURZEL, M. (1956)- The pH dependence of enzimic ester hydrolisis.
Biochem. J., 63, 684-690.

BERGMAN, F. RIMON, S., SEGAL, R. (1958)
Effects of pH on the activity of the esterase towards different substrates;
Biochem. J., 68, 493-499.

BIANCHI, C.P. (1961) - The effect of caffeine on radiocalcium movement in frog sartorius.
J. Gen. Physiol., 44, 845-858.

BLIOCH, Z.L., GLAGOLEVA, I.M., LIBERMAN, E.A., NENASHEV, V.A. (1968) - A study of the mechanism of quantal transmitter release at a chemical synapse.
J. Physiol. (Lond.), 199, 11-35.

BOYD, I.A., MARTIN, A.R. (1956) - Spontaneous subthreshold activity at mammalian neuromuscular junctions.
J. Physiol. (Lond.), 132, 61-73.

BRAUN, M., SCHMIDT, R.F., ZIMMERMAN, M. (1966). - Facilitation at the frog neuromuscular junction during and after repetitive stimulation.
Pflügers Arch. Ges. Physiol., 287, 41-55.

BROOKS, A.E., HUTTER, O.F. (1963) - Effect of extracellular pH on electrical activity of skeletal muscle.
Biochem. Pharmac., 12 (suppl), 266-267.

BROOKS, V.B. (1956) - An intracellular study of the action of repetitive nerve volleys and of Botulinum toxin on miniature end plate potential.
J. Physiol. (Lond.), 134, 264-277.

BURKE, W. (1957) - Spontaneous potentials in slow muscle fibres of the frog.
J. Physiol. (Lond.), 135, 511-521.

CAMEJO, G., VILLEGAS, G.M., BARNOLA, F.V., VILLEGAS, R. (1969) - Characterization of two different membrane fractions isolated from the first stellar nerves of the squid "Dosidicus Gigas".
Biochem. Biophys. Acta, 193, 247

CANEPA, F.G. (1964) - Acetylcholine quanta .
Nature, 201, 184-185.

CECCARELLI, B., HURLBUT, W.P., MAURO, A. (1973) - Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction.
J. Cell. Biol., 57, 499-524.

CHANDLER, W.K., HODGKIN, A.L., MEVES, H. (1965) - The effect of changing the internal solution on sodium inactivation and related phenomena in giant axons.
J. Physiol. (Lond.), 180, 821-836.

COLQUHOUN, D., RANG, H.P., RITCHIE,J.M. (1974) - The binding of tetrodotoxin and α Bungarotoxin to normal and denervated mammalian muscle.
J. Physiol (Lond.), 240, 199-226.

COLQUHOUN, D., DIONNE, V.E., STEINBACH, J.M., STEVENS, C.F. (1975) - Conductance of channels opened by acetylcholine like drugs in muscle end-plate.
Nature, 253, 204-206.

COOKE, J.D., QUASTEL, D.M.J. (1973) - The specific effect of potassium on transmitter release by motor nerve terminals and its inhibition by calcium.
J. Physiol. (Lond.), 228, 435 - 458.

COOKE, J.D., QUASTEL, D.M.J. (1973) - Transmitter release by mammalian motor nerve terminals in response to focal polarization.
J. Physiol. (Lond.), 228, 377-405.

COUTEAUX, R. (1947) - Contribution à l'étude de la synapse myoneurale "Buisson de Kuhne et plaque motrice".
Rev. Can. Biol., 6, 563-711.

COUTEAUX, R. (1955) - Localization of cholinesterases at neuromuscular junctions.
Intern. Rev. Cytol., 4, 335-375.

COUTEAUX, R., PECOT-DECHAVASSINE, M. (1970) - Vésicules synaptiques et poches au niveau des "zones actives" de la jonction neuro-musculaire.
C.R. Acad. Sci. Paris, 271, 2346-2349.

COUTEAUX, R., PECOT-DECHAVASSINE, M. (1973) - Données ultrastructurales et cytochimiques sur le mécanisme de libération de l'acétylcholine dans la transmission synaptique.
Arch. Ital. Biol., 111, 231-262.

COUTEAUX, M.R., PECOT-DECHAVASSINE,M. (1974) - Les zones spécialisées des membranes pré-synaptiques.
C.R. Acad. Sc. Paris, 278, 291-293.

DALE, H., FELDBERG, W., VOGT, M. (1936) - Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings.
J. Physiol. (Lond.), 86, 353-380.

DE ROBERTIS, E., BENNETT, H.S. (1954) - Submicroscopic vesicular component in the synapse.
Fed. Proc., 73, 38 .

DEL CASTILLO, J. STARK, L. (1952) - The effect of calcium ions on the motor end-plate potentials.
J. Physiol. (Lond.), 116, 507-515.

DEL CASTILLO, J., MACHNE, X. (1953)- Effect of temperature on the passive electrical properties of the muscle fibre membrane.
J. Physiol. (Lond.), 120, 431-434.

DEL CASTILLO, J., KATZ, B. (1954a) - Quantal components of the end-plate potential.
J. Physiol. (Lond.), 124, 560-573.

DEL CASTILLO, J., KATZ, B. (1954b) - Statistical factors involved in neuro-muscular facilitation and depression.
J. Physiol. (Lond.), 124, 574-585

DEL CASTILLO, J., KATZ, B. (1954c) - Changes in end plate activity produced by pre-synaptic polarisation.
J. Physiol. (Lond.), 124, 586-604.

DEL CASTILLO, J.,KATZ, B (1954d) - The membrane change produced by the neuromuscular transmitter.
J. Physiol. (Lond.), 125, 546-565.

DEL CASTILLO, J., KATZ, B. (1955a) - On the localization of acetylcholine receptors.
J. Physiol. (Lond.), 128, 157-181.

DEL CASTILLO, J. KATZ,B (1955b) - Local activity at a depolarized nerve-muscle junction.
J. Physiol. (Lond.), 128, 396-411.

DEL CASTILLO, J., KATZ, B. (1956a) - Localization of active spots within the neuromuscular junction of the frog.
J. Physiol.(Lond.), 132, 63o-649.

DEL CASTILLO, J., KATZ,B. (1956b) - Biophysical aspects of neuromuscular transmission.
Prog. Biophys.Molec. Biol., 6, 121-170.

DEL CASTILLO,J. NELSON, T.E. Jr, SANCHEZ, V. (1962) - Mechanism of the increased acetycholine sensitivity of skeletal muscle in low pH solutions.
J. Cell. Comp. Physiol, 59, 35-44.

DREYER,F. PEPER,K., AKERT,K., SANDRI, C., MOOR, H. (1973) -Ultrastructure of the"active zone" in the frog neuromuscular junction . Brain Res., 62, 373-380.

DREYER, F., PEPER, K., (1974) - Iontophoretic application of Acetylcholine : advantages of high resistance micropipette in connection with an electronic pump. Pflügers Arch., 348, 263-272.

DREYER, F., PEPER, K., (1974) - The acetylcholine sensitivity in the vecinity of the neuromuscular junction of the frog. Pflügers Arch., 348, 273-286.

DROUIN, H., THE, R. (1969) - The effect of reducing extracellular pH on the membrane currents of the Ranvier node. Pflügers Arch., 313, 80-88.

DUDEL, J., KUFFLER, S.W. (1961) - The quantal nature of transmission and spontaneous miniature potentials at the crayfish neuromuscular junction. J. Physiol. (Lond.), 155, 514-529.

EBASHI,S. ENDO,M. (1968) - Calcium ion and muscle contraction. Prog. Biophys. Mol. Biol., 18, 123-183.

ECCLES, J.C., O'CONNOR, W.J. (1939) - Responses which nerve impulses evoke in mammalian striated muscle. J. Physiol. (Lond.), 97, 44-102.

ECCLES, J.C., KATZ, B., KUFFLER, S.W. (1941) - Nature of the end-plate potential in curarized muscle.
J. Neurophysiol., 4, 362-387.

ECCLES, J.C., KATZ, B., KUFFLER, S.W. (1942) - Effect of eserine on neuromuscular transmission.
J. Neurophysiol., 5, 211-230.

ECCLES, J.C., MacFARLANE, W.V. (1949) - Actions of anticholinesterases on end plate potential of frog muscle.
J. Neurophysiol., 12, 59-80.

ECCLES, J.C., JAEGER, J.C. (1958) - The relationship between the mode of operations and the dimensions of the junctional region at synapses and motor end-organs.
Proc. Roy. Soc., Ser. B, 148, 38-56

ELMQVIST, D., HOFMANN, W.W., KUGELBERG, J., QUASTEL, D.M.J. (1964) - An electrophysiological investigation of neuromuscular transmission in mya sthenia gravis.
J. Physiol. (Lond.), 174, 417-434.

ELMQVIST, D., QUASTEL, D.M.J. (1965a) - Presynaptic action of hemicholinium at the neuromuscular junction.
J. Physiol. (Lond.), 177, 463-482.

ELMQVIST, D. QUASTEL, D.M.J. (1965b) - A quantitative study of end plate potentials in isolated human muscle.
J. Physiol. (Lond.), 178, 505-529.

ELUL, R. (1967) - Fixed charge in the cell membrane.
J. Physiol. (Lond.), 189, 351-365.

FAMBROUGH, D.M., HARTZELL, H.C. (1972) - Acetylcholine receptors : number and distribution at neuromuscular junction in Rat diaphragm.
Science, 176, 189-191.

FATT, P., KATZ, B. (1950) - Some observations on biological noise.
Nature, 166, 597-598.

FATT, P., KATZ, B. (1951) - An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode.
J. Physiol. (Lond.), 115, 320-370.

FATT, P. KATZ, B. (1952) - Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings.
J. Physiol. (Lond.), 117, 109-128.

FELTZ, A., MALLART, A. (1971) - An analysis of acetylcholine responses of junctional and extrajunctional receptors of frog muscle fibres.
J. Physiol (Lond.), 218, 85-100.

FENG, T.P. (1940) - Studies on the neuromuscular junction. XVIII. The local potentials around N-M junctions induced by single and multiple volleys.
Chin. J. Physiol., 15, 367-404.

FERTUCK, H.C., SALPETER, M.M. (1974) - Localization of acetylcholine receptor by (125 I) α - Bungarotoxin in binding at mouse motor end plates.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 1376-1378.

FRANKENHAEUSER, B., HODGKIN, A.L. (1957) - The action of calcium on the electrical properties of squid axons.
J. Physiol. (Lond.), 137, 218-244.

FRANKENHAEUSER, B. (1957) - The effect of calcium on the myelinated nerve fibre.
J. Physiol. (Lond.), 137, 245-260.

FUHRMAN, G.J., FUHRMAN, F.A. (1961) - Effects of temperature on the actions of drugs.
Ann. Rev. Pharmacol., 1, 65-78.

FURSHPAN, E.J. (1956) - The effects of osmotic pressure changes on the spontaneous activity at motor nerve endings.
J. Physiol. (Lond.), 134, 689-697.

GAGE, P.W. (1965a) - The effect of methyl, ethyl, and n-propyl alcohol on neuromuscular transmission in the Rat.
J. Pharmacol. Exper. Ther., 150, 236-243.

GAGE, P.W., QUASTEL, D.M.J. (1965b) - Dual effect of potassium on transmitter release.
Nature, 206, 625-626.

GAGE, P.W., ARMSTRONG, C.M. (1968) - Miniature end-plate currents in voltage-clamped muscle fibres.
Nature (Lond.), 218, 363-365.

GAGE, P.W., MacBURNEY, R.N. (1972) - Miniature end-plate currents and potentials generated by quanta of acetylcholine in glycerol treated toad sartorius fibres.
J. Physiol. (Lond.), 226, 79-94.

GAGE, P.W., MacBURNEY, R.N. (1973) - An analysis of the relationship between the current and potential generated by a quantum of acetylcholine in muscle fibres without transverse tubules.
J. Membrane Biol., 12, 247-272.

GAGE, P.W., MacBURNEY, R.N., VAN HELDEN, D. (1974) - End plate currents are shortened by Octanol : possible role of membrane lipid.
Life Sci., 14, 2277-2283.

GAGE, P.W., MacBURNEY, R.N. (1975) - Effects of membrane potential temperature and neostigmine on the conductance change caused by a quantum of acetylcholine at the toad neuromuscular junction.
J. Physiol. (Lond.), 244, 385-407.

GAGE, P.W., MacBURNEY, R.N., SCHNEIDER, G.T. (1975) - Effects of some aliphatic alcohols on the conductance change caused by a quantum of acetylcholine at the toad end-plate.
J. Physiol. (Lond.), 244, 409-429.

GINSBORG, B.L. (1960) - Spontaneous activity in muscle fibres of the chick.
J. Physiol. (Lond.), 150, 707-717.

GINSBORG, B.L. (1973) - Electrical changes in the membrane in junctional transmission.
Biochim. Biophys. Acta, 300, 289-317.

GOLDMAN, D.E. (1943) - Potential, impedance and rectification in membranes.
J. gen. Physiol., 27, 37-60.

GOPFERT, H., SCHAEFER, H. (1938) - Uber den direkt und indirekt erregeten Aktionsstrom und die Funktion der motorischen Endplatte.
Pflügers Arch. ges. Physiol., 239, 597-619.

GRAUERS, S. (1952) - The influence of pH on the enzimic hydrolisis of acetylcholine.
Acta Chem. Scand.,6, 1223-1231.

HALL, Z.W. (1973) - Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in end plate and non end-plate regions of Rat diaphragm muscle.
J. Neurobiol., 4, 343-362.

HARTZELL, H.C., FAMBROUGH, D.M. (1972) - Acetylcholine receptors : distribution and extrajunctional density in Rat diaphragm after denervation, correlated with acetylcholine sensitivity.
J. gen. Physiol., 60,248-262.

HESS, A. PILAR, G. (1963) - Slow fibres in the extraocular muscles of the Cat.
J. Physiol. (Lond.), 169, 780-798.

HEBB., C. (1972) - Biosynthesis of acetylcholine in nervous tissue.
Physiol. Rev., 52, 918-952.

HEUSER, J. KATZ, B., MILEDI, R. (1971) - Structural and functional changes of frog neuromuscular junctions in hig calcium solutions.
Proc. Roy. Soc. Ser. B., 178, 407-415

HEUSER, J., MILEDI, R. (1971) - Effect of Lanthanum ions on function and structure of frog neuromuscular junctions.
Proc. Roy. Sc. Ser.B., 179, 247-260.

HILLE, B. (1968) - Charges and potentials at the nerve surface Divalents ions and pH.
J. gen. Physiol., 51, 221-236.

HODGKIN, A.L., KATZ, B. (1949) - The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid.
J. Physiol. (Lond.), 108, 37-77.

HODGKIN, A.L., RUSHTON, W.A.H. (1946) - The electrical constants of a crustacean nerve fibre.
Proc. Roy. Soc. Ser. B, 133, 444-479.

HODGKIN, A.L. NAKAJIMA, S. (1972) - The effects of diameter on the electrical constants of frog skeletal muscles fibres.
J. Physiol. (Lond.), 221, 105-120.

HUBBARD, J.I. (1961)- The effect of calcium and magnesium on the spontaneous release of transmitter from mammalian motor nerve endings.
J. Physiol. (Lond.) 159, 507-517.

HUBBARD, J.I. (1963) - Repetitive stimulation at the mammalian neuromuscular junction and the mobilization of transmitter.
J. Physiol. (Lond.), 169, 641-662.

HUBBARD, J.I., JONES, S.F., LANDAU, E.M. (1968a) - On the mechanism by which calcium and magnesium affect the spontaneous release of transmitter from mammalian motor nerve terminal.
J. Physiol. (Lond.), 194, 355-380.

HUBBARD, J.I., JONES, S.F., LANDAU, E.M. (1968b) - On the mechanism by which calcium and magnesium affect the release of transmitter by nerve impulses.
J. Physiol. (Lond.), 196, 75-86.

HUBBARD, J.I., JONES, S.F., LANDAU, E.M. (1971) - The effectof temperature change upon transmitter release, facilitation and post-tetanic potentiation.
J. Physiol. (Lond.), 216, 591-609.

HURLBUT, W.P., LONGENEKER, H.B., MAURO, A. (1971) - Effects of calcium and magnesium on the frequency of miniature end plate potentials during prolonged tetanization.
J. Physiol. (Lond.), 219, 17-38.

HUTTER, O.F., TRAUTWEIN, W. (1956) - Neuromuscular facilitation by stretch of motor nerve-endings.
J. Physiol. (Lond.), 133,610-625.

HUTTER, O.F., WARNER, A.E. (1967) - The pH sensitivity of the chloride conductance of frog skeletal muscle.
J. Physiol. (Lond.), 189, 403-425.

ITO, M., OSHIMA, T. (1964) - The electrogenic action of cations on Cat spinal motoneurons.

Proc. Roy. Soc. Ser. B. 161, 92-108.

JENKINSON, D.H. (1960) - The antagonism between tubocurarine and substances which depolarize the motor end-plate.

J. Physiol. (Lond.) 152 , 309-324.

JONES, S.F., KWANBUNBUMPEN, S. (1970a) - The effects of nerve stimulation and hemi cholinium on synaptic vesicles at the mammalian neuromuscular junction.

J. Physiol. (Lond.) 207 , 31-50.

JONES, S.F., KWANBUNBUMPEN, S. (1970b) - Some effects of nerve stimulation and hemicholinium on quantal transmitter release at the mammalian neuromuscular junction.

J. Physiol. (Lond.) 207 , 51-61.

KALOW, W. (1954) - The influence of pH on the ionization and Biological activity of d-Tubocurarine.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 110, 433-442.

KATZ, B., Thesleff, S. (1957) - On the factors which determine the amplitude of the miniature end-plate potential.

J. Physiol. (Lond.) 137 , 267-278.

KATZ, B. (1962) - The transmission of impulses from nerve to muscle and the subcellular unit of synaptic action.

Proc. Roy. Soc. Ser. B 155 , 455-479.

KATZ, B., MILEDI, R. (1965) - The effect of temperature on the synaptic delay at the neuromuscular junction.
J. Physiol. (Lond.) 181, 656-670.

KATZ, B., MILEDI, R. (1967a) - Tetrodotoxin and neuromuscular transmission .
Proc. Roy. Soc. (Lond.) Ser.B. 167, 8-22

KATZ, B., MILEDI, R. (1967b) - The release of acetylcholine from nerve endings by graded electrical pulses.
Proc. Roy. Soc. Ser.B. 167, 1-7.

KATZ, B. (1969a) - The release of neural transmitter substances.
Liverpool Univ. Press.

KATZ, B., MILEDI, R. (1969b) - Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium ringer.
J. Physiol. (Lond.) 203, 689-706.

KATZ, B., MILEDI, R. (1970) - Membrane noise produced by acetylcholine
Nature 226, 962-963.

KATZ, B., MILEDI, R. (1971) - Further observations on acetylcholine noise.
Nature (New. Biol.) 232, 124-126.

KATZ, B., MILEDI, R. (1972) - The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components.
J. Physiol. (Lond.) 224 , 665-699

KATZ, B., MILEDI, R. (1973a) - The binding of acetylcholine to receptors and its removal from synaptic cleft.
J. Physiol. (Lond.) 231, 549-574.

KATZ, B., MILEDI, R. (1973b) - The characteristics of "end-plate noise" produced by different depolarizing drugs.
J. Physiol. (Lond.) 230, 707-717.

KOELLE, G.B., FRIEDENWALD, J.S. (1949) - A histochemical method for localizing cholinesterase activity.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70 , 617-622.

KORDAS, M. (1968) - A study of the end-plate potential in sodium deficient solution.
J. Physiol. (Lond.) 198 , 81-90.

KORDAS, M. (1968) - The effect of Atropine and Curarine on the time course of the end-plate potential in frog sartorius muscle.
Int. J. Neuropharmac. 7 , 523-530.

KORDAS, M. (1969) - The effect of membrane polarization on the time cours of the end-plate current in frog sartorius muscle.
J. Physiol. (Lond.) 204 , 493-502.

KORDAS, M. (1972a) - An attempt at an analysis of the factors determining the time course of the end-plate current. I : The effects of Prostigmine and the ratio of Mg^{2+} to Ca^{2+}.
J. Physiol. (Lond.) 224 , 317-332.

KORDAS, M. (1972b) - An attempt at an analysis of the factors determining the time course of the end-plate current. II : Temperature.
J. Physiol. (Lond.) 224 , 333-348.

KRNJEVIC, K., MILEDI, R. (1958) - Acetylcholine in mammalian neuromuscular transmission.
Nature, (Lond.) 182 , 805-806.

KRNJEVIC, K., MILEDI, R. (1959) - Presynaptic failure of neuromuscular propagation in Rats.
J. Physiol. (Lond.) 149, 1-22.

KRNJEVIC, K., MITCHELL, J.F. (1961) - The release of acetylcholine in the isolated Rat diaphragm.
J. Physiol.(Lond.) 155 , 246-262.

KRNJEVIC, K.S., STRAUGHAN, D.W. (1964) - The release of acetylcholine from the denervated Rat diaphragm.
J. Physiol. (Lond.) 170, 371-378.

KUBA, K., TOMITA, T. (1971) - Effect of Prostigmine on the time course of the end-plate potential in the Rat diaphragm.
J. Physiol. (Lond.) 213, 533-544.

KUBA, K., ALBUQUERQUE, E.X., DALY, J., BARNARD, E.A. (1974) - A study of the irreversible cholinesterase inhibitor diisoprophyl-fluorophosphate, on time course of end-plate currents in frog sartorius muscle.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 189, 499-512.

KUEHNE, W. (1887) - Neue Untersuchungen über motorische Nervenendigungen.
Z. Biol. 23, 1-148.

KUFFLER, S.W. (1942) - Electrical potential changes at an isolated nerve muscle junction.
J. Neurophysiol. 5, 18-26.

KUNO, M., TURBANIS, S.A., WEAKLY, J.N. (1971) - Correlation between nerve terminal size and transmitter release at the neuromuscular junction of the frog.
J. Physiol. (Lond.) 213, 545-556.

LANDAU, E.M. (1969) - The interaction of pre-synaptic polarisation with calcium and magnesium in modifying spontaneous transmitter release from mammalian motor nerve terminals.
J. Physiol. (Lond.), 203, 281-299.

LEMEIGNAN, M. (1975) - Communication personnelle sur les effets de la 4-amino pyridine sur la transmission neuromusculaire.

LEVIN, A.P., JANDORF, B.J. (1955) - Inactivation of cholinesterase by compounds related to neostigmine .
J. Pharmac. Exp. Ther., 113, 206-211.

LEVINE, L. (1966) - Tip potentials in microelectrodes filled by boiling under reduced pressure.
Experientia, 22, 559-560.

LI, C. (1958) - Effect of cooling on neuromuscular transmission in the Rat.
Am. J. Physiol., 194, 200-206.

LI, C., GOURAS, P. (1958) - Effect of cooling on neuromuscular transmission in the frog.
Am. J. Physiol., 192, 464-470.

LILEY, A.W., NORTH, K.A.K.(1953) - An electrical investigation of effects of repetitive stimulation on mammalian neuromuscular junction.
J. Neurophysiol., 16, 509-527.

LILEY, A.W. (1956a) - An investigation of spontaneous activity at the neuromuscular junction of the Rat.
J. Physiol. (Lond.), 132, 650-666.

LILEY, A.W. (1956b) - The quantal components of the mammalian end-plate potential.
J. Physiol. (Lond.), 133, 571-587.

LILEY, A.W. (1956c) - The effect of pre-synaptic polarization on the spontaneous activity at the mammalian neuromuscular junction.
J. Physiol. (Lond.) , 134, 427-443.

LING, G., GERARD, R.W. (1949) - The normal membrane potential of frog sartorius fibres.
J. Cell Comp. Physiol., 34, 383-396.

LING, G., WOODBURY, J. (1949) - The effect of temperature on the membrane potential of frog muscle fibres.
J. Cell Comp. Physiol., 34, 407-412.

LONGENECKER, H.E., HURLBUT, W.P., MAURO, A., CLARK, A.W. (1970) - Effects of black widow spider venom on the frog neuromuscular junction.
Nature (Lond.), 225, 701-705.

LUCAS, K, (1908) - The temperature coefficient of the rate of conduction in nerve.
J. Physiol. (Lond.) , 37, 112-121.

MAENO, T. (1966) - Analysis of sodium and potassium conductances in the procaïne end-plate potential.
J. Physiol. (Lond.), 183, 592-606.

MALLART, A., TRAUTMANN, A. (1973) - Ionic properties of the neuromuscular junction of the frog : effect of denervation and pH.
J. Physiol. (Lond.), 234, 553-567.

MAGLEBY, K.L., STEVENS, C.F. (1972a) - The effect of voltage on the time course of end-plate currents.
J. Physiol. (Lond.) , 223, 151-171.

MAGLEBY, K.L., STEVENS, C.F. (1972b) - A quantitative description of end-plate currents.
J. Physiol. (Lond.), 223, 173-197.

MAGLEBY, K.L., TERRAR, D.A. (1975) - Factors affecting the time course of decay of end-plate currents : a possible cooperative action of acetylcholine on receptors at the frog neuromuscular junction.
J. Physiol. (Lond.), 244, 467-495.

MAINWOOD, G.W., LEE, S.L. (1968) - The hyperpolarizing effect of hydrogen ions on transmembrane potential in frog's skeletal muscle.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 46, 151-157.

MAMBRINI, J., BENOIT, P.R. (1964) - Action du calcium sur la junction neuromusculaire chez la Grenouille.
C.R. Séance Soc. Biol., 158, 1454-1458

MARTINEZ-CARRION, M., RAFTERY, M.A. (1973) - Use of a fluorescent probe for the study of Ligand binding by the isolated cholinergic receptor of Torpedo californica.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 55, 1156-1164.

MEIRI, U., RAHAMIMOFF, R. (1971) - Activation of transmitter release by strontium and calcium ions at the neuromuscular junction.
J. Physiol (Lond.), 215, 709-726.

MEVES, H., VOLKNER, K. (1958) - Die Wirkung von CO_2 auf das ruhemembran potential und die elektrischen Konstanten der quergestreiften muskelfaser.
Pflügers Arch. Ges. Physiol., 265, 457-476.

MILEDI, R. (1960a) - The acetylcholine sensitivity of frog muscle fibres after complete or partial denervation.
J. Physiol. (Lond.) , 151, 1-23.

MILEDI, R. (1960b) - Junctional and extrajunctional acetylcholine receptors in skeletal muscle fibres.
J. Physiol. (Lond.), 151, 24-30.

MILEDI, R., THIES, R.E. (1967) - Post-tetanic increase in frequency of miniature end-plate potentials in calcium-free solutions. J. Physiol. (Lond.), 192, 54-55.

MILEDI, R.,THIES, R.E. (1971a)- Tetanic and post-tetanic rise in frequency of miniature end-plate potential in low calcium solutions. J. Physiol. (Lond.) 212, 245-257.

MILEDI, R., POTTER, L.T. (1971b) - Acetylcholine receptors in muscle fibres. Nature, 233, 599-603.

NACHSHEN, D., LANDAU, E.M. (1974) - The effects of pH changes on transmitter release at the frog neuromuscular synapse. Abstracts of the XXVI Internation. Congress of Physiological Sciences. Jerusalem Satellite Symposia : October, 1974, 12.

NEGRETE, J., DEL CASTILLO, J., ESCOBAR, I., YANKELE VICH, G. (1972) - Spreading activation of end-plate receptors by single transmitter quanta. Nature, New Biol., 235, 158-159.

PECOT-DECHAVASSINE, M. (1970) - Effets conjurés du pH et des cations divalents sur la libération spontanée d'acétylcholine au niveau de la plaque motrice de la Grenouille. C.R. Acad. Sci, Paris, 271, 674-677.

PECOT-DECHAVASSINE, M.,COUTEAUX, R. (1971) - Recherches sur la signification physiologique et structurale des potentiels miniature d'amplitude anormale observés au niveau de la jonction neuro-musculaire de la Grenouille dans diverses conditions expérimentales. J. Physiol. (Paris), 63, 138A.

PECOT-DECHAVASSINE, M., COUTEAUX, R. (1972) - Potentiels miniatures d'amplitude anormale obtenus dans des conditions expérimentales et changments concomitants des structures présynaptiques. C.R. Acad. Sci.Paris, 275, 983-986.

PEPER, K., Mc MAHAN, U.J. (1972) - Distribution of acetylcholine receptor in the vicinity of nerve terminals on skeletal muscle of the frog. Proc. Roy. Soc. (Lond.), Ser. B, 181, 431 - 440.

PEPER, K, DREYER, F., SANDRI, C., AKERT, K., MOOR, H. (1974) - Structure and ultrastructure of the frog motor end plate. Cell. Tiss. Res., 149, 437-455.

PORTER, C.W., BARNARD, E.A., CHIU, T.H. (1973) - The ultrastructural localization and quantitation of cholinergic receptors at the mouse motor end plate. J. Membrane Biol., 14, 383-402.

PORTER, C.W., BARNARD, E.A. (1975) - The density of cholinergic receptors at the end-plate post-synaptic membrane. Ultrastructural studies in two mammalian species. J. Membrane Biol., 20, 31-49.

POTTER, L.T. (1970) - Synthesis, storage and release of (C^{14}) acetylcholine in isolated Rat diaphragm muscles.
J. Physiol. (Lond.), 206, 145-166.

QUASTEL, D.M.J., HACKETT, J.T., COOKE, J.D. (1971) - Calcium : is it required for transmitter secretion ?
Sci., 172, 1034-1036.

QUASTEL, D.M.J. (1974) - Excitation-Secretion coupling at the mammalian neuromuscular junction.
in : "Synaptic transmission and neuronal interaction"
Bennett, MVL ed, Raven Press, 23-45

RAMON y CAJAL, S. (1909) - Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.
Paris, Ed. Maloine.

REMLER, M.P. (1973) - A semi quantitative theory of synaptic vesicle movements.
Biophys. J.13, 104-117.

RIEMER, J., MAYER, C.M., ULBRECHT, G. (1974) - Determination of membrane potential in smooth muscle cells using micro-electrodes with reduced tip potentials.
Pflügers Arch., 349, 267-275.

ROTSHENKER, S., RAHAMIMOFF, R. (1970) - Neuromuscular synapse : stochastic properties of spontaneous release of transmitter.
Sci., 170, 648-649.

SACHS, F. LECAR, H. (1973) - Acetylcholine "noise" in tissue culture muscle cells.
Nature, 246, 214-216.

SCHUELER, F.W., (1960) - The mechanism of action of the hemicholiniums.
Int. Rev. Neurobiol., 2, 77-97.

SHANES, A.M. (1958) - Electrochemical aspects of physiological and pharmacological action in excitable cells. Part I : The resting cell and its alteration by extrinsic factors.
Pharmacol. Rev., 10, 59-164.

SHANES, A.M., BIANCHI, C.P. (1959) - The distribution and kinetics of release of radiocalcium in tendon and skeletal muscle.
J. Gen. Physiol., 42, 1123-1137.

SHRAGER, P. (1974) - Ionic conductance changes in voltage clamped crayfish axons at low pH.
J. Gen. Physiol., 64, 666-690.

SNYDER, C.D. (1911) - On the meaning of variation in the magnitude of temperature coefficients of physiological processes.
Ann. J. Physiol., 28, 165-175.

SOKOLL, M.D., THESLEFF, S. (1968) - Effects of pH and uranyl ions on action potential generation and acetylcholine sensitivity of skeletal muscle.
Europ. J. Pharmacol., 4, 71-76

SPERELAKIS, N. (1969) - Changes in conductance of frog sartorius produced by CO_2, Re O_4 and temperature.
Am. J. Physiol., 217, 1060-1075.

SPYROPOULOS, C.S. (1960) - Cytoplasmic pH of nerve fibres.
J. Neurochem., 5, 185-194.

STEVENS, C.F. (1974) - Kinetics of post-synaptic membrane response at the neuromuscular junction.In :"Synaptic transmission and neuronal interaction.
Bennett, M.V.L., Editeur, Raven Press, N.Y., 45-58

STRAUGHAN, D.W. (1960) - The release of Acetylcholine from mammalian motor nerve endings.
Brit. J. Pharmacol., 15, 417-424

TAKEUCHI, N. (1958) - The effect of temperature on the neuromuscular junction of the frog.
Jap. J. Physiol., 8, 391-404.

TAKEUCHI, A., TAKEUCHI, N. (1959a) - Active phase of frog's end-plate potential.
J. Neurophysiol., 22, 395-411.

TAKEUCHI A., (1959b) - Neuromuscular transmission of the fish skeletal muscles investigated with intracellular microelectrodes.
J. cell Comp. Physiol., 54, 211-220.

TAKEUCHI, A., TAKEUCHI, N. (1960) - Further analysis of relationship between end-plate potential and end-plate current.
J. Neurophysiol., 23, 397-402.

TAKEUCHI, A., TAKEUCHI, N. (1960) - On the permeability of end-plate membrane during the action of transmitter.
J. Physiol. (Lond.), 154, 52-67.

TAKEUCHI, A., TAKEUCHI, N. (1961) - Changes in potassium concentration around motor nerve terminals produced by current flow and their effects on neuromuscular transmission.
J. Physiol. (Lond.), 155, 46-58.

TAKEUCHI,N. (1963) - Some properties of conductance at the end-plate membrane during the action of acetylcholine.
J. Physiol. (Lond.), 167, 128-140.

THOMAS, R.C. (1974) - Intracellular pH of snail neurones measured with a new pH sensitive glass micro-électrode.
J. Physiol. (Lond.), 238, 159-180.

TURKANIS, S.A. (1973) - Effects of muscle stretch on transmitter release at end-plates of Rat diaphragm and frog sartorius mucle.
J. Physiol. (Lond.), 230 , 391-403.

VAN DER KLOOT, W., KITA, H. (1973) - The possible role of fixed membrane surface charges in acetylcholine release at the frog neuromuscular junction.
J. Membrane Biol., 14, 365-382.

VOS, J., KURIYAMA, K., ROBERTS, E. (1968) - Electrophoretic mobilities of brain sub-cellular praticles and binding of ϒ aminobutyric acid, acetylcholine, norepinephrine, and 5-hydroxytryptamine.
Brain Res.,9, 224-230.

WAAN, K.T., GOLDSMITH, M.W. (1972) - Reduction of tip potential arefacts in micro electrode measurements.
Nature, (Lond.), 238, 44-45.

WERNIG, A. (1975a) - Estimates of statistical release parameters from crayfish and frog neuromuscular junctions.
J. Physiol. (Lond.), 244, 207-221.

WERNIG, A. (1975b) - Quantum hypothesis of synaptic transmission.
J. Neural Transmission, suppl. XII.

WILSON, I.B., BERGMAN, F. (1950) - Studies on cholinesterase VII. The active surface of acetylcholine esterase derived from effect of pH on inhibitors.
J. Biol.Chem., 185, 479-489.

WILSON, I.B. (1952) - Acetylcholinesterase XII. Further studies of binding forces.
J. Biol. Chem., 197, 215-225.

WILSON, I.B. (1955) - The interaction of tensilon and neostigmine with acetylcholinesterase.
Arch. Int. Pharmacodyn., 104, 204-213.

YEH, J.Z., NARAHASHI, T. (1974) - Noncholinergic mechanism of action of cholinergic drugs on squid axon membranes.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 189, 697-707.